B-LYMPHOZYTENAKTIVIERUNG DURCH SYNTHETISCHE LIPOPEPTIDE: MOLEKULARE EREIGNISSE AN DER MEMBRAN BEI DER LYMPHOZYTENSTIMULIERUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

LOTHAR BIESERT

aus Essen

1988

UNIV.
LIBRARY
ILL.

B-LYMPHOZYTENAKTIVIERUNG DURCH SYNTHETISCHE LIPOPEPTIDE: MOLEKULARE EREIGNISSE AN DER MEMBRAN BEI DER LYMPHOZYTENSTIMULIERUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
LOTHAR BIESERT
aus Essen

1988

Tag der mündlichen Prüfung:	12.11.1987
Dekan:	Prof. Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Bessler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie II, Arbeitsbereich Mikrobiologie und Immunologie, der Universität Tübingen und am Institut für Immunbiologie der Universität Freiburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Bessler durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Bessler. Er hat die Anregung zu dieser Arbeit gegeben, mich in das Gebiet der Immunologie eingeführt und mir durch wohlwollende Betreuung und durch seine ständige Bereitschaft zur Diskussion sehr geholfen.

Frau Prof. Dr. S. von Kleist und Herrn Prof. Dr. V. Braun danke ich herzlich für ihr Interesse. Durch die bereitwillige Überlassung der apparativen Einrichtungen wurde die Durchführung der Arbeit wesentlich erleichtert.

Frau Priv. Doz. Dr. Sunna Hauschildt und Frau Sabine Philippi danke ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, insbesondere für die Unterstützung bei der Untersuchung des Polyphosphoinositstoffwechsels.

Herrn Dr. Bernhard Kleine danke ich für die Anleitung und die Hilfe bei der Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

Herr Karl-Heinz Wiesmüller und Herr Jörg Metzger waren an der Durchführung der Aminosäureanalysen wesentlich beteiligt.

Herr Ranjit Bhardwaj hat mich bei den Experimenten mit der HL-60 Zellinie hilfreich unterstützt.

Die Mitglieder der Arbeitsgruppe haben durch ihr kollegiales Verhalten eine Atmosphäre guter Zusammenarbeit geschaffen.

Für die Gewährung eines Promotionsstipendiums danke ich der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Dem Direktorium des Georg-Speyer-Hauses in Frankfurt, Frau Priv. Doz. Dr. H. Rübsamen-Waigmann und Herrn Prof. Dr. med. H.D. Brede, danke ich für die Möglichkeit, die erworbenen Kenntnisse und Fähigkeiten auf dem Gebiet der AIDS-Forschung anzuwenden.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0033

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	
1.1	Einführung	1
1.2	Lipoprotein und synthetische Lipopeptide als B-Zell-Mitogene	3
1.3	Mitogenrezeptoren	4
1.4	Molekulare Veränderungen bei B- und T-Lymphozyten nach der mitogenen Stimulation	8
2.	AUFGABENSTELLUNG	14
3.	MATERIAL UND METHODEN	
3.1	Materialien	16
3.1.1	Versuchstiere	16
3.1.2	Zellinien, Primärzellen	16
3.1.3	Mitogene, Antiseren	17
3.1.4	Chemikalien	18
3.1.5.	Medien, Puffer	18
3.1.6	Geräte	20
3.2	Methoden	
3.2.1	Allgemeine zelluläre Arbeitstechniken	21
3.2.1.1	Kultivieren und Waschen der Immunzellen	21
3.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Tumorzellen	21
3.2.1.3	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest	22
3.2.2	Stimulationsexperimente	22
3.2.2.1	Präparation der Milzzellen	22
3.2.2.2	Vorbereitung der Mitogene	23
3.2.2.3	Stimulationstest	23
3.2.3	Bindungsstudien mit Fluorescein-markiertem Lipopeptid	24
3.2.3.1	Markierung von Tumorzellen	24
3.2.3.2	Markierung von Milz- und Thymuszellen	24
3.2.3.3	Analyse der Lipopeptid-markierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop	25
3.2.3.4	FACS-Analyse der Lipopeptid-markierten Tumorzellen	25
3.2.4	Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Differenzierung der humanen promyeloischen Zellinie HL-60	25
3.2.4.1	Kultivierung der Leukämiezellinie HL-60	25
3.2.4.2	Isolierung humaner Granulozyten aus peripherem Blut	26
3.2.4.3	Färbung der Zellen nach Pappenheim	27
3.2.4.4	Immunhistologische Charakterisierung der Zellen	27
3.2.5	Metabolische Markierung von Lymphozytenproteinen	29
3.2.5.1	Präparation der Milzzellen	29
3.2.5.2	Präparation ruhender B-Lymphozyten	29
3.2.5.3	Präparation aktivierter B-Lymphozyten	30
3.2.5.4	Markierung aktivierter Milzzellen mit (^{3}H)Leucin	31

3.2.5.5	^{32}P-Orthophosphatmarkierung aktivierter B-Lymphozyten	31
3.2.5.6	^{32}P-Orthophosphatmarkierung von B-Lymphoblasten und aktivierten Milzzellen	32
3.2.5.7	^{35}S-Methioninmarkierung aktivierter B-Lymphozyten	33
3.2.5.8	^{35}S-Methioninmarkierung von B-Lymphoblasten und aktivierten Milzzellen	33
3.2.5.9	^{35}S-Sulfatmarkierung von B-Lymphoblasten und aktivierten Milzzellen	34
3.2.6	Präparation der markierten Lymphozytenproteine	35
3.2.6.1	Solubilisierung durch Nonidet P40	35
3.2.6.2	Anreicherung der markierten Membranproteine mit Triton X-114	35
3.2.7	Analyse radiomarkierter Lymphozytenproteine durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese	36
3.2.7.1	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	36
3.2.7.1.1	Erste Dimension: Isoelektrische Focussierung	38
3.2.7.1.2	Messung des pH-Gradienten	39
3.2.7.1.3	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrorese (Flachbettgele)	39
3.2.7.2	Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
3.2.7.2.1	Herstellung des Flachbettgradientengels	41
3.2.7.2.2	Vorbehandlung der Proben	42
3.2.7.2.3	Durchführung der Elektrophorese	43
3.2.7.3	Bestimmung der relativen Molekülmasse von Proteinen	43
3.2.7.4	Nachweis der Proteine durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau	43
3.2.7.5	Nachweis radioaktiv markierter Proteine durch Fluorographie	44
3.2.7.6	Sensibilisierung der Röntgenfilme	45
3.2.7.7	Autoradiographie der markierten Proteine	45
3.2.8	Wirkung synthetischer Lipopeptide auf den Phosphoinositstoffwechsel	45
3.2.8.1	Markierung ruhender Milzzellen mit myo-(2-^{3}H)Inosit	45
3.2.8.2	Extraktion der markierten Insitverbindungen	47
3.2.8.3	Analyse der inosithaltigen Phospholipide	47
3.2.8.4	Trennung der wasserlöslichen Inositphosphate	48
3.2.9	Affinitätschromatographische Anreicherung von Bindeproteinen für synthetische Lipopeptide	49
3.2.9.1	Synthese der Affinitätssäule	49
3.2.9.1.1	Kopplung von TPP an derivatisierte Glaspartikel	49
3.2.9.1.2	Bindungskontrolle durch Aminosäureanalyse	50
3.2.9.1.3	Inaktivierung der freien Aminogruppen am Trägermaterial	50
3.2.9.1.4	Überprüfung der Acetylierung durch Bestimmung der primären Aminogruppen	51
3.2.9.1.5	Modifizierung des Liganden während der Acetylierungsreaktion	51
3.2.9.2	Bindeproteine im Mausserum für synthetische Lipopeptide	52
3.2.9.2.1	Blutentnahme und Serumgewinnung bei der Maus	52
3.2.9.2.2	Affinitätschromatographische Trennung von Serumproteinen	53
3.2.9.2.3	Bestimmung der unspezifischen Adsorption	53

3.2.9.2.4	Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	54
3.2.9.3	Lymphozytenbindeproteine für synthetische Lipopeptide	55
4.	ERGEBNISSE	
4.1	Stimulationsexperimente	56
4.1.1	Mitogenität des für die Kopplung verwendeten TPP	56
4.1.2	Mitogenität von acetyliertem TPP	58
4.1.3	Mitogenität von Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4(FITC)_{2-4}$-OH	60
4.2	Bindungsstudien mit FITC-markiertem Lipopeptid	61
4.2.1	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	61
4.2.1.1	Bindung des FITC-Lipopeptids an Tumorzellen	61
4.2.1.2	Bindung des FITC-Lipopeptids an Leukozyten	63
4.2.1.3	Lokalisation des gebundenen Lipopeptids	64
4.2.2	FACS-Bindungsanalyse von FITC-Lipopeptid-markierten Tumorzellen	66
4.3	Einfluß synthetischer Lipopeptide auf Wachstum und Differenzierung der promyeloischen Leukämiezellinie HL-60	69
4.3.1	Kultivierung von HL-60 in Gegenwart verschiedener Differenzierungsinduktoren	69
4.3.2	Morphologische Veränderungen	71
4.3.3	Immunhistologische Charakterisierung der morphologisch veränderten Zellen	72
4.4	Metabolische Markierung von Lymphozyten unter dem Einfluß von TPP und LPS	76
4.4.1	^{32}P-Orthophosphateinbau in aktivierte B-Lymphozyten	76
4.4.2	^{32}P-Orthophosphateinbau in B-Lymphoblasten	78
4.4.3	^{32}P-Orthophosphateinbau in aktivierte Milzzellen	79
4.4.4	^{35}S-Methionineinbau in aktivierte B-Lymphozyten	80
4.4.5	^{35}S-Methionineinbau in B-Lymphoblasten	81
4.4.6	^{35}S-Methionineinbau in aktivierte Milzzellen	82
4.4.7	^{35}S-Sulfateinbau in B-Lymphoblasten	84
4.4.8	^{35}S-Sulfateinbau in aktivierte Milzzellen	85
4.4.9	^{3}H-Leucineinbau in aktivierte Milzlymphozyten	87
4.5	Analyse der radioaktiv markierten Lymphozytenproteine	88
4.5.1	Markierung aktivierter Milzzellen mit (^{3}H)Leucin	88
4.5.2	^{35}S-Methioninmarkierung aktivierter B-Lymphozyten	89
4.5.3	^{35}S-Methioninmarkierung von B-Lymphoblasten	91
4.5.4	^{35}S-Methioninmarkierung aktivierter Milzzellen aus verschiedenen Mausstämmen	93
4.5.5	^{32}P-Orthophosphatmarkierung aktivierter B-Lymphozyten	95
4.5.6	^{32}P-Orthophosphatmarkierung von B-Lymphoblasten	97
4.5.7	^{32}P-Orthophosphatmarkierung aktivierter Milzzellen aus verschiedenen Mausstämmen	98
4.5.8	Markierung von B-Lymphoblasten mit (^{35}S)Sulfat	100
4.5.9	Markierung von mitogenaktivierten Milzzellen aus verschiedenen Mausstämmen mit (^{35}S)Sulfat	101
4.6	Einfluß synthetischer Lipopeptide auf den Phosphoinositstoffwechsel	102
4.6.1	Analyse der Inositphosphate	102
4.6.2	Analyse der inosithaltigen Phospholipide	104

4.7	Synthese der Affinitätssäule	107
4.7.1	Kopplung von Tripalmitoylpentapeptid an Glaspartikel	107
4.7.2	Acetylierung der Aminopropylgruppen	108
4.7.3	Stabilität des Affinitätsharzes	109
4.7.4	Acetylierung von Tripalmitoylpentapeptid	109
4.8	Bindeproteine im Serum für Tripalmitoylpentapeptid	111
4.8.1	Trennung der Serumproteine an einer Lipopeptid-Affinitätssäule	111
4.8.2	Relative Molekülmassen der an CPG-TPP adsorbierten Proteine	113
4.8.3	Bestimmung der unspezifischen Proteinadsorption	114
4.8.4	Vergleich der an CPG-TPP und CPG-NHAc adsorbierten Proteine	115
4.9	Lymphozytenbindeproteine für synthetische Lipopeptide	116
4.9.1	Affinitätschromatographische Trennung ^{3}H-Leucin-markierter Proteine Lipopeptid-stimulierter Milzzellen	116
4.9.2	Relative Molekülmassen der affinitätschromatographisch angereicherten Lipopeptid-Bindeproteine	117
4.9.3	Charakterisierung der Lipopeptid-Bindeproteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese	119

5.	DISKUSSION	
5.1	Lymphozytenaktivierung durch synthetische Lipopeptide	121
5.2	Bindungsstudien mit Fluorescein-markiertem Lipopeptid	125
5.3	Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Differenzierung der humanen promyeloischen Leukämielinie HL-60	131
5.4	Bedeutung des Phosphoinositstoffwechsels bei der Lymphozytenaktivierung durch Lipopeptide	134
5.5	Phosphorylierung von Lymphozytenproteinen während der Zellaktivierung durch bakterielle B-Zell-Mitogene	137
5.6	Neusynthese und posttranslationale Modifikationen von Proteinen Lipopeptid-aktivierter Lymphozyten	144
5.7	Bindeproteine für synthetische Lipopeptide	148
6.	ZUSAMMENFASSUNG	154
7.	LITERATURVERZEICHNIS	156

Abkürzungen

AA	Acrylamidstammlösung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
ßPSG	2-Mercaptoethanol, Penicillin, Streptomycin, Glutamin
CaM	Calmodulin
CoA	Coenzym A
Con A	Concanavalin A
CPG	porenkontrolliertes Glas
CPG-TPP	porenkontrolliertes Glas, derivatisiert mit TPP
CPG-NHAc	porenkontrolliertes Glas, mit Acetanhydrid derivatisiert
cpm	Zählrate pro Minute
DG	1,2-Diacylglycerin
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FCS	fötales Rinderserum
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IP_3	Inosit-1,4,5-trisphosphat
IP_2	Inosit-1,4-bisphosphat
IP	Inosit-1-monophosphat
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MEM	Minimalmedium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MW	Molekülmasse
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PI	Phosphatidylinosit(phosphate)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtInsP	Phosphatidylinosit-4-monophosphat
$PtInsP_2$	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat
RPMI	Züchtungsmedium (Roswell Park Memorial Institute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TPP	Tripalmitoylpentapeptid: S-(2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-cysteinyl-(S)-seryl-(S)-seryl-(S)-asparaginyl-(S)-alanin

1. EINLEITUNG

1.1 EINFÜHRUNG

Vertebraten besitzen ein Abwehrsystem, das sie gegen Fremdsubstanzen, Viren, Bakterien und Protozoen schützt und das auf das Eindringen solcher körperfremden Stoffe (Antigene) mit einer Immunantwort reagiert (1). Neben einer unspezifischen Abwehr hat sich im Laufe der Evolution ein spezifischen System entwickelt. Es basiert auf vier wesentlichen Eigenschaften: Unterscheidung von Selbst/Nicht-Selbst, Spezifität, Variabilität und immunologischem Gedächnis. Die spezifische Immunreaktion ist das Resultat eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Zellpopulationen und Subpopulationen und ihrer löslichen Sekretionsprodukte. Je nach Art des Antigens werden unterschiedliche Zelltypen aktiviert.

Bei der humoralen Immunantwort wird lösliches Antigen von Oberflächenrezeptoren der B-Lymphozyten erkannt und gebunden, worauf sich die betroffenen Zellen zu teilen beginnen und zu antikörpersezernierenden Plasmazellen differenzieren. Damit sich eine ruhende B-Zelle nach Antigenbindung vermehren kann, ist eine Wechselwirkung mit Makrophagen und Helfer-T-Lymphozyten notwendig. Nach einem Modell von F. Melchers läßt sich die antigenspezifische B-Zell-Aktivierung in drei Schritte unterteilen (2). Im ersten Schritt löst die Aufnahme des Antigens durch akzessorische Zellen die nachfolgende Präsentation von Antigendeterminanten auf der Zelloberfläche und die Bildung von a-Faktoren aus, darunter Interleukin-1. Das auf der Membran der akzessorischen Zellen exprimierte Antigen wird zusammen mit Histokompatibilitätsantigenen der Klasse II von antigenspezifischen T-Helferzellen erkannt, die daraufhin ß- und g-Faktoren freisetzen. Im zweiten Schritt findet eine Kooperation zwischen der aktivierten T-Helferzelle und einer antigenspezifischen, histokompatiblen B-Zelle statt, wobei der T-Zell-Rezeptor gebundenes Antigen zusammen mit Ia-Determinanten auf der B-Zelle erkennt. Ausgelöst durch diese B-T-Zellinteraktion exprimiert der B-Lymphozyt Rezeptoren für die im ersten Schritt

freigesetzten Faktoren. Im dritten Schritt erfolgen Teilung und Reifung der B-Zelle unter Beteiligung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren.
Die Fähigkeit zur Antigenpräsentation ist im übrigen nicht allein auf Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen beschränkt. Das an den Immunglobulinrezeptor der B-Lymphozyten gebundene Antigen kann internalisiert, prozessiert und auf der Zelloberfläche zusammen mit MHC-Antigenen reexprimiert werden. Aus diesem Befund entwickelte A. Lanzavecchia ein neues Modell der B-Zell-Aktivierung unter ausschließlicher Beteiligung von T- und B-Lymphozyten (3).

Bei der zellulären Immunantwort entstehen als Effektorzellen cytotoxische T-Lymphozyten, die zellgebundenes Antigen zusammen mit Histokompatibilitätsantigenen der Klasse I erkennen und die dazugehörige Zielzelle lysieren. An der Regulation der Immunantwort sind noch Suppressor-T-Lymphozyten beteiligt, die eine unkontrollierte Proliferation der aktivierten T-Helfer- und B-Zellen verhindern (1).

Lymphozyten werden nicht nur durch Antigene aktiviert, sondern auch durch Mitogene. Viele dieser Substanzen lösen neben einer Proliferation auch eine Differenzierung der Zellen aus. Hierzu gehören pflanzliche Lektine wie Phytohämagglutinin, Concanavalin A (Con A) und Pokeweed-Mitogen (4), Zellwandkomponenten gramnegativer Bakterien wie Lipopolysaccharid (LPS) (5), Lipoprotein und Protein I (6) und Antikörper gegen lymphozytäre Oberflächenproteine (7). Während Pokeweeed-Mitogen sowohl T- als auch B-Lymphozyten aktiviert, wirken die meisten Lektine selektiv auf T-Zellen, viele bakterielle Oberflächenkomponenten dagegen vor allem auf B-Zellen. Im Gegensatz zu einem Antigen, das einige spezifische Klone aktiviert, sind Mitogene in der Lage, unter geeigneten Bedingungen bis zu 70% der T- bzw. B-Lymphozyten polyklonal, d.h. unabhängig von ihrer Spezifität, zu stimulieren (8). Damit ergibt sich die Möglichkeit, mit Hilfe solcher Substanzen Aktivierungs- und Differenzierungsmechanismen von Lymphozyten zu untersuchen.

1.2 LIPOPROTEIN UND SYNTHETISCHE LIPOPEPTIDE ALS B-ZELL-MITOGENE

Die Zellwand gramnegativer Bakterien besteht aus mehreren Schichten: innen liegt die Cytoplasmamembran, die von einer Peptidoglycanschicht umgeben ist; daran schließt sich der periplasmatische Raum an, der von der äußeren Membran begrenzt wird.
Eines der Strukturproteine aus der äußeren Membran von Escherichia coli ist das Lipoprotein, das von V. Braun und Mitarbeitern isoliert und charakterisiert wurde (9). Es besitzt eine Molekülmasse von 7200 Da, besteht aus 58 Aminosäuren und enthält am N-terminalen S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteinrest drei Fettsäuren, von denen zwei in einer Ester-, die dritte in einer Amidbindung vorliegen. Über die e-Aminogruppe des C-terminalen Lysins ist das Protein kovalent an den Mureinsacculus des Bakteriums gebunden (10); daneben wurden auch freie Mono- bzw. Dimere von Lipoprotein nachgewiesen (11). Gegenüber B-Lymphozyten verschiedener Spezies wirkt Lipoprotein in vitro und in vivo als polyklonaler Aktivator (12-14). Es wirkt wie LPS thymusunabhäng.
Durch enzymatische Verdauung von Lipoprotein konnten lipidhaltige Fragmente isoliert werden, die noch die volle biologische Aktivität besaßen (15). Damit wurde gezeigt, daß der lipophile Molekülteil - ähnlich wie beim LPS (16) - für die mitogenen Eigenschaften verantwortlich ist. In Zusammenarbeit unserer Gruppe mit G. Jung und seinen Mitarbeitern K.H. Wiesmüller und J. Metzger wurden einige dem N-terminalen Teil von Lipoprotein analoge Lipopeptide synthetisiert und im biologischen Test untersucht (17-19). Tripalmitoylpentapeptid (TPP) besitzt dieselbe Aminosäurezusammensetzung wie der N-Terminus des Lipoproteins, unterscheidet sich aber in der Fettsäurezusammensetzung, da es nur Palmitinsäurereste enthält. Die biologische Aktivität des synthetischen Lipopeptids war mit der des nativen Lipoproteins vergleichbar (20,21).

Synthetische Lipopeptide aktivieren nicht nur B-Lymphozyten, sondern auch Zellen des Retikulohistiozytären Systems wie Mono-

zyten/Makrophagen oder neutrophile Granulozyten (22). Makrophagen werden zur Produktion von Interleukin-1 (23) sowie zur Sekretion verschiedener Prostaglandine (24) angeregt. Eine direkte Wirkung der Lipopeptide auf T-Lymphozyten wurde - ebenso wie auch bei Lipoprotein - bisher nicht gefunden.

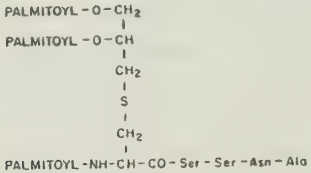

Abb. 1: Strukturformel von Tripalmitoylpentapeptid

1.3 MITOGENREZEPTOREN

Die Zellen des Immunsystems enthalten auf ihrer Oberfläche Strukturen, über die sie mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung treten. Zur Erkennung körperfremder Stoffe besitzen die Lymphozyten charakteristische Moleküle: die im Thymus gereiften T-Lymphozyten exprimieren die T-Zell-Rezeptoren, die aus dem Knochenmark stammenden B-Lymphozyten die Immunglobulinrezeptoren. Neben diesen antigenspezifischen Rezeptoren findet man auf der Lymphozytenoberfläche u.a. die Histokompatibilitätsantigene der Klassen I und II, Rezeptoren für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und weitere Membranproteine, die für die wechselseitige Erkennung der Immunzellen von Bedeutung sind.

Wie die von der Spezifität des Immunglobulinrezeptors unabhängige Aktivierung von B-Lymphozyten durch Mitogene (25) ausgelöst wird, ist ungeklärt. Weitgehend besteht jedoch die Ansicht, daß B-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche Mitogenrezeptoren besitzen (27,28). Für die polyklonalen B-Zell-Aktivatoren TPP und LPS deuten zahlreiche Befunde auf das Vorliegen spezifischer Bindungsstellen hin. Ein direkter Nachweis für die Existenz eines Mitogenrezeptors wurde bisher nur von einer Arbeitsgruppe beschrieben. Es sind zwei Mausstämme bekannt (C3H/HeJ und C57BL/10.Sc.Cr), die infolge eines genetischen Defektes

im lps-Locus des Chromosoms 4 nicht in der Lage sind, in vivo und in vitro auf LPS mit einer Proliferation zu antworten (28,29). A. Coutinho et al. konnten mit einem Fluorescein-markierten Antiserum gegen LPS-Responderzellen Milzzellen von Responder-, nicht aber von LPS-Nonrespondermäusen anfärben (30). Die Bindung dieses Serums an LPS-Responderlymphozyten war durch Vorinkubation der Zellen mit LPS oder Lipid A hemmbar (31). Diese Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen antigenen Determinanten, die durch das Antiserum erkannt werden, und einer membrangebundenen Struktur, die spezifisch den Lipid A-Teil des LPS erkennt, hin. Bei "Cocapping"-Versuchen wurde nachgewiesen, daß die LPS-Bindungsstelle nicht identisch mit den Oberflächenimmunglobulinen ist, beide sich jedoch gegenseitig beeinflussen (32). Verschiedene andere Experimente zeigten (33,34), daß die Unfähigkeit der Nonrespondermäuse, auf LPS zu antworten, sich nicht allein auf einen Defekt der B-Lymphozyten beschränkt. A. Coutinho postulierte aus diesen Befunden, daß bei Nonrespondermäusen die Zellen deshalb nicht auf LPS antworten können, weil der LPS-Rezeptor, bedingt durch eine Mutation, nicht exprimiert wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen von A. Jakobovits und Mitarbeitern (35), die B-Lymphozyten von LPS-Nonresponder- mit Membranvesikeln von LPS-Respondermäusen fusionierten, wobei die modifizierten Lymphozyten sich durch LPS stimulieren ließen. Die Unfähigkeit von Lymphozyten, auf ein bestimmtes Mitogen zu reagieren, scheint demnach auf dem Fehlen tranferierbarer, noch unbekannter Plasmamembrankomponenten zu beruhen. Y. Eda et al. konnten allerdings bei Nonrespondermäusen eine Proliferationsantwort auf LPS auslösen, indem sie bestimmte Cytoplasmafraktionen aus LPS-stimulierten C3H/HeN Milzzellen in B-Lymphozyten von C3H/HeJ Mäusen injizierten (36). Offensichtlich enthält das Cytoplasma von aktivierten Responderzellen Komponenten, die nach Transfer in Nonresponderzellen den genetisch bedingten Defekt dieser Lymphozyten umgehen können und eine Weiterleitung des Aktivierungssignals von der Plasmamembran zum Zellkern ermöglichen. T. Watanabe et al. konnten zeigen, daß der Zellkern bei LPS-nichtreaktiven Zellen funktionell intakt ist. Sie fusionierten Karyoplasten aus C3H/HeJ Milzzellen mit Milzzellen von C3H/HeN

Mäusen, deren DNA-Synthese durch Mitomycin C inhibiert worden war, und konnten das Fusionsprodukt mit LPS zur Proliferation stimulieren (37).

Untersuchungen über die Bindung von LPS und Lipid A an Milzzellen von Nonresponder- und Respondermäusen führten zu widersprüchlichen Befunden. H. Nygren konnte mit Meerrettichperoxidase-markiertem LPS einen deutlichen Unterschied in der Bindungsfähigkeit nachweisen (38), während andere Autoren (39-41) mit ^{3}H-LPS und ^{125}J-markiertem Lipid A dies nicht bestätigen konnten. M. Kern entwickelte unter Berücksichtigung der gleichen Bindungskinetiken von Responder- und Nonresponder-B-Lymphozyten die Hypothese, daß bei LPS-vermittelten Reaktionen wenigstens zwei experimentell voneinander abgrenzbare Prozesse ablaufen, nämlich die spezifische Mitogenbindung und die Auslösung des Aktivierungssignals. Demnach sollen Nonrespondermäuse nur die Fähigkeit zur Signalauslösung verloren haben, nicht jedoch die Mitogenbindungsstelle (42).
Auch über die Bindung von LPS an B- und T-Lymphozyten von Respondermäusen liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. C. Bona fand nach Inkubation mit ^{3}H-LPS sowohl für B- als auch für T-Zellen ein Bindungsmaximum nach 12 h (43). Andererseits konnte D. Jacobs auf Einzelzellebene durch Immunfluoreszenzstudien nachweisen, daß von den 50%-60% der Milzzellen, die LPS gebunden hatten, 80% membrangebundenes IgM besaßen (44). Danach bindet LPS vorwiegend an reife B-Lymphozyten und nur zu einem geringen Teil an T-Lymphozyten und andere Immunzellen.

Einige Befunde legen nahe, daß für die einzelnen Mitogene, die chemisch und strukturell sehr verschieden sind, unterschiedliche Rezeptoren existieren. So können B-Lymphozyten aus LPS-Nonrespondern durch Lipoprotein stimuliert werden (12). Weiterhin enthalten normale Mausstämme B-Zell-Subpopulationen, die auf Lipoprotein, nicht jedoch auf LPS antworten (46). B. Kleine konnte Klone des B-Lymphoms WEHI 279.1, dessen Wachstum normalerweise durch LPS inhibiert wird, selektionieren, die nicht durch diese Mitogen gehemmt werden. Es zeigte sich, daß die Sensitivität auf Lipoprotein und Dextransulfat in diesen

Klonen von der Reaktivität gegenüber LPS unabhängig segregiert (45). Das Vorhandensein Lipopeptid-spezifischer Bindeproteine wird unter anderem deshalb postuliert, weil Diastereomere von TPP, die sich in ihrer Konfiguration am S-(2,3-diacyloxypropyl)-cysteinrest unterscheiden, unterschiedliche mitogene Aktivität besitzen.

Während für die Untersuchungen am LPS-Rezeptor zwei LPS-Nonresponder- und die entsprechend nahe verwandten Responderstämme zur Verfügung stehen, wurden Lipoprotein-Nonrespondermäuse bisher nicht entdeckt. In unserer Arbeitsgruppe wurden von R. Sprenger neben den bekannten Responderstämmen weitere 37 Mausstämme auf Reaktivität gegenüber synthetischen Lipopeptiden getestet (48). Als Vergleich und zur internen Kontrolle wurde auch die jeweilige Antwort auf LPS untersucht. Dabei deutete sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Proliferationsantwort und dem Ia-Haplotyp an. Gleichzeitig wurde die Unabhängigkeit der Reaktivität gegenüber Lipopeptiden und LPS bestätigt. Diese Befunde wurden durch Frequenzbestimmungen von Vorläufern reaktiver B-Zellen mittels Grenzverdünnungsanalyse und durch Bestimmung der Immunglobulin-Isotyp-Verteilung nach Aktivierung mit TPP und LPS erhärtet.

Für Lipoprotein (49) und dessen synthetischem Analogon TPP konnten in unserer Arbeitsgruppe durch W. Scheuer einige membrangebundene Bindeproteine aus Milzzellen durch Affinitätschromatographie angereichert und charakterisiert werden. Neben den leichten und schweren Ketten der Immunglobuline wurden die Genprodukte des MHC-Komplexes (H-2D-, H-2K- und Ia-Antigene) identifiziert (50). K. Yokoyama et al., die LPS-Bindeproteine untersuchten, erhielten ähnliche Resultate (51). Eine spezifische Interaktion von Mitogenen mit MHC-codierten Proteinen wird auch deshalb postuliert, weil sich die Bindung von ^{3}H-LPS an B- und T-Lymphozyten durch anti-H-2 und anti-Ia Sera inhibieren ließ. Weiterhin konnten J. Niederhuber et al. in Gegenwart von Kaninchenkomplement durch ein anti-Ia Serum die Proliferationsantwort auf LPS unterdrücken (52). R. Wolfert wies nach, daß bei B-Lymphozyten verschiedene Membranproteine in Ge-

genwart von LPS mit I-A und I-E Genprodukten neue Proteinkomplexe bilden (53,54).

1.4 MOLEKULARE VERÄNDERUNGEN BEI B- UND T-LYMPHOZYTEN NACH DER MITOGENEN STIMULATION

Jede Zelle besitzt ein Kommunikationssystem, das in der Lage ist, externe Signale zu empfangen, weiterzuleiten und diese gezielt in interne Signale umzuwandeln. Rezeptoren auf der Zelloberfläche wirken als Empfänger externer Stimuli wie z.B. Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und Hormone und leiten die Information von der Zellaußenseite durch die Plasmamembran hindurch ins Cytoplasma. Durch die Bildung von sekundären Botenstoffen kann sich das Signal innerhalb der Zelle ausbreiten und so die zelluläre Antwort auslösen.
Das am besten untersuchte Signalsystem benutzt als sekundären Botenstoff cAMP (55). Bisher ist es nicht gelungen, den molekularen Mechanismus zu identifizieren, der eine Aktivierung von B-Lymphozyten durch TPP und LPS auslöst. Nach der Mitogenbindung an die Zelloberfläche wird ein noch unbekanntes Signal von der Membranaußen- zur Membraninnenseite geleitet, wodurch submembrane Strukturen verändert und Enzymsysteme im Cytoplasma aktiviert werden, die schließlich zur DNA-Synthese und Zellteilung führen.

Ein wichtiger Schritt für die Induktion der Lymphozytenaktivierung scheint die Quervernetzung spezifischer Oberflächenrezeptoren durch di- oder multivalente Liganden zu sein (56). Nach der spezifischen Ligandenbindung aggregieren die dabei gebildeten Ligand-Rezeptor Komplexe ("patching") und bilden eine kappenförmige Struktur ("capping"), die entweder internalisiert oder von der Zelloberfläche abgeschilfert wird ("shedding") (57). Für Anti-IgM Immunglobulinkomplexe wurde gezeigt, daß die von der Zelle aufgenommenen Aggregate unter Mitwirkung der Lysosomen proteolytisch abgebaut werden. Neusynthetisierte Immunglobulinrezeptoren konnten frühestens nach 6 h auf der Lymphozytenoberfläche nachgewiesen werden (58).

Unter dem Einfluß von Mitogenen oder gegen Oberflächenimmunglobuline gerichteter Antikörper findet eine Neuorientierung bestimmter Membranproteine statt, die wahrscheinlich durch die Quervernetzung der Ligandenbindungsstellen ausgelöst wird. Die Assoziation von membrangebundenem Immunglobulin mit möglichen Mitogenrezeptoren wurde durch "Cocapping"-Versuche nachgewiesen (32). Weiterhin konnte durch quervernetzende Reagentien gezeigt werden, daß sich in Gegenwart von LPS neue Proteinkomplexe auf der Lymphozytenoberfläche bilden (54).

Innerhalb weniger Minuten nach der Mitogenbindung und Aggregation der Rezeptormoleküle ändern eine Reihe von Membranenzymen ihre Aktivität. Ursache dafür ist wahrscheinlich eine generelle Änderung der Membranlipidzusammensetzung und eine Veränderung der Membranfluidität. Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell von S. Singer (59) sind die Lipide der Plasmamembran asymmetrisch in einer Doppelschicht angeordnet und bilden Domänen, die durch eine konstante Lipidzusammensetzung charakterisiert sind. Es konnte gezeigt werden (60), daß eine Reihe von Membranproteinen in ganz bestimmte Lipiddomänen integriert sind. Die Bindung eines Liganden an den spezifischen Rezeptor führt infolge der Quervernetzung der Oberflächenrezeptoren zu einer lokalen Veränderung in der Lipidorganisation und damit zu einer veränderten Phospholipidzusammensetzung, wodurch mit dem Rezeptor assoziierte Enzyme ihre Aktivität ändern. K. Resch konnte auf der Oberfläche von T-Lymphozyten Molekülkomplexe nachweisen (61), die durch Assoziation des Con A-Rezeptors mit der (Na^+-K^+)-ATPase und Acyl CoA-Lysolecithin-Acyltransferasen gebildet werden. Die Aktivierung dieser Acyltransferasen führte zu einem verstärkten Einbau langkettiger, ungesättigter Fettsäuren in die Phospholipide. Dies konnte sowohl nach der Stimulation von T-Lymphozyten durch Con A (62) als auch nach Einwirkung von Lipoprotein auf B-Lymphozyten gezeigt werden. Weiterhin wurde eine Aktivitätserhöhung von Methyltransferasen beobachtet, die eine Methylierung von Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin und den Transfer dieses Phospholipids zur Außenseite der Lipiddoppelschicht katalysierten (60). Durch die Aktivierung der beiden Enzymsysteme erhöht sich die Fluidität der Plasma-

membran, wodurch die Konformation und die laterale Diffusion der Membranproteine beeinflußt werden. Die Änderungen in der Lipidzusammensetzung und der Membranfluidität führen schließlich zur Aktivierung oder Inhibierung einer Reihe membrangebundener Enzyme. Durch Con A stimuliert wurde die (Na^+-K^+)ATPase (62). Daneben wurden Ionenkanäle aktiviert, wodurch es zu einer erhöhten Aufnahme von K^+- und Ca^{2+}-Ionen kam (63,64). Als Folge des Mitogenstimulus erhöhte sich auch die Permeabilität der Membran für Nucleoside (65), Zucker (66) und Aminosäuren (67). Weiterhin wurde die Aktivierung einer Serinesterase beschrieben (68). Durch Con A inhibiert wurden dagegen die 5'-Nucleotidase, die γ-Glutamyltransferase, die alkalische Phosphatase und die Mg^{2+}-ATPase (62).

B-Lymphozyten können auch durch submitogene Mengen von Phorboldiester und Calciumionophore polyklonal stimuliert werden (69), und es wurde gezeigt, daß dabei die Proteinkinase C (PK-C) aktiviert wird (70). Ein ähnliches Resultat wurde nach der Aktivierung von B-Lymphozyten durch Anti-IgM beobachtet (71). Es wird diskutiert, daß die rezeptorvermittelte Hydrolyse von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat ($PtdInsP_2$), die eine intrazelluläre Freisetzung von Calcium-Ionen durch Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und die Aktivierung der PK-C durch 1,2-Diacylglycerin (DG) zur Folge hat, den entscheidenden Stoffwechselweg bei der Signalübermittlung durch polyklonale B-Zell-Aktivatoren darstellt. Man nimmt an, daß nach der Bindung des Signalmoleküls an den spezifischen Oberflächenrezeptor über ein stimulatorisch wirkendes G-Protein die Aktivierung einer spezifischen Phosphodiesterase (Phospholipase C) ausgelöst wird. Diese spaltet daraufhin $PtdInsP_2$ in DG und IP_3, die als sekundäre Botenstoffe wirken (72). IP_3 ist wasserlöslich und kann daher ins Cytoplasma diffundieren, wo es eine Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum auslöst. Calciumionen wiederum regulieren eine Vielzahl von Stoffwechselreaktionen (73). Mit Calmodulin (CaM) bilden sie einen Komplex, der seinerseits mehrere Ca^{2+}/CaM-abhängige Proteinkinasen aktiviert. Durch Ca^{2+}-Ionen aktiviertes CaM stimuliert die Aktivität der Adenylatcyclase und zugleich die der cAMP-Phos-

phodiesterase, wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration gesteuert wird. Inaktiviert wird IP_3 durch spezifische Phosphatasen. Das dabei gebildete Inosit reagiert mit CDP-Diacylglycerin zu Phosphatidylinosit, welches mit Phosphatidylinosit-4-monophosphat und Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat im Gleichgewicht steht (74). Die inosithaltigen Phospholipide sind vorwiegend an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert.
1,2-Diacylglycerin kommt normalerweise nicht in der Zellmembran vor, wird aber vorübergehend als Antwort auf extrazelluläre Signale durch Hydrolyse von $PtdInsP_2$ gebildet. Es verbleibt in der Cytoplasmamembran, wo es die PK-C aktiviert, indem es die Affinität des Enzyms für Ca^{2+}-Ionen erhöht. Die PK-C ist ein Ca^{2+}- und Phospholipid-abhängiges Enzym, das zwei funktionell verschiedene Domänen enthält. Die regulatorisch wirkende, hydrophobe Region bindet nach der Zellaktivierung an die Cytoplasmamembran, so daß sich ein quaternärer Komplex aus PK-C, DG, Phospholipid und Ca^{2+}-Ionen bildet. Die hydrophile Domäne katalysiert die Phosphorylierung zahlreicher Proteine an Seryl- und Threonylresten (75). Inaktiviert wird DG entweder durch Phosphorylierung zu Phosphatidsäure oder durch eine Diacylglycerin-Lipase unter Bildung von Monoacylglycerin und Arachidonsäure (72). Phorbolester imitieren den Effekt von DG, indem sie die PK-C irreversibel aktivieren, ohne daß die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration ansteigt. Demgegenüber ahmen Ionophore das physiologische Signal von IP_3 nach und erhöhen die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, wodurch es auch zu einer Aktivierung der PK-C kommen kann (76). Für die LPS-induzierte B-Zell-Aktivierung wurde eine Translokation der PK-C vom Cytosol an die Plasmamembran beschrieben, ohne das eine Hydrolyse von $PtdInsP_2$ beobachtet wurde (77,78). Die durch Dextransulfat aktivierten Phosphatidylinositkinasen wurden durch LPS inhibiert, und zwar sowohl bei Responder- als auch bei Nonrespondermäusen (79).

Über die PK-C wird wahrscheinlich auch das Na^+-H^+-Transportsystem aktiviert, das den Austausch von extrazellulären Natriumionen gegen intrazellulär freigesetzte Protonen reguliert (80). Nach Zugabe von LPS oder Anti-IgM zu B-Zellen erfolgte innerhalb Minuten ein Anstieg des intrazellulären pH-Wertes,

eine Konzentrationserhöhung der Natriumionen und eine Depolarisation der Plasmamembran (81). Die pH-Änderung im Cytoplasma wird von einigen Arbeitsgruppen als entscheidendes Auslösesignal für die Zellteilung angesehen (80). W. Moolenaar stellte die Hypothese auf, daß der Na^+-H^+-Translokator an seiner cytoplasmatischen Domäne durch die PK-C phosphoryliert wird und dadurch seine Affinität für intrazelluläre Protonen erhöht (82).

Bei Lektin-stimulierten T-Lymphozyten wurde weiterhin eine Aktivierung der Guanylatcyclase beschrieben (83). Dieses Enzym katalysiert die Bildung von cGMP, dessen Konzentration im Cytoplasma nach Mitogeneinwirkung vorübergehend ansteigt. cGMP ist ein sekundärer Botenstoff und aktiviert die Proteinkinasen G, die wiederum spezifisch Proteine phosphorylieren, deren Funktionen jedoch noch unbekannt sind. Ausgelöst wird die Aktivierung der Guanylatcyclase durch eine vorübergehende Akkumulation von Lysophosphatidylcholin während des Einbaus ungesättigter Fettsäuren in die Phospholipide (84). Möglicherweise wird das Enzym auch durch Hydrolyseprodukte von Inositlipiden stimuliert (85).

Andere Arbeitsgruppen sehen dagegen in der Phosphorylierung von Proteinen das entscheidende Signal auf externe Stimuli (86). Die Proteinkinasen A, C, G und die Ca^{2+}/CaM-abhängigen Kinasen phosphorylieren die Proteine fast ausschließlich an Seryl- und Threonylgruppen. Neben cytoplasmatischen Proteinen wurden eine Reihe von Membranproteinen als Phosphoproteine identifiziert. Bei den Rezeptoren für Insulin und für Wachstumsfaktoren wurde nach der Ligandenbindung eine Autophosphorylierung von Tyrosylgruppen des Rezeptorproteins gefunden (87), deren Bedeutung für die Rezeptorfunktion noch unbekannt ist. Bei Anti-IgM- und TPA-stimulierten B-Lymphozyten wurde ein ähnliches Muster von neusynthetisierten Phosphoproteinen gefunden (81), was auf einen ähnlichen Mechanismus bei der Signalübertragung schließen läßt.

Nach Einwirkung von LPS oder Anti-IgM auf B-Lymphozyten wurde im Cytoplasma eine Erhöhung der mRNA-Konzentration für das zel-

luläre Protooncogen c-myc (88) sowie für die MHC-Antigene der Klasse II beobachtet (81). Das c-myc Genprodukt ist ein Kernprotein und spielt eventuell bei der Initiation der DNA-Synthese eine Rolle. Die vermehrte Expression der Ia-Antigene auf der Membranoberfläche von B-Lymphozyten, die man 6-8 h nach Zugabe eines B-Zell-Mitogens beobachten kann (89), ist für eine effektive Kooperation zwischen T- und B-Zellen von Bedeutung, weil diese Moleküle sowohl Erkennungs- als auch Restriktionselemente darstellen. Ausgelöst durch die Lymphozytenaktivierung findet eine vermehrte Neusynthese verschiedener cytoplasmatischer und membrangebundener Proteine statt, darunter von Rezeptoren für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, bevor eine Verdopplung der DNA nachweisbar ist. In LPS-aktivierten Lymphozytenkulturen teilen sich die Zellen etwa alle 13 h. Bei permanenter Anwesenheit des Mitogens im Kulturmedium konnten F. Melchers et al. fünf bis sieben Zellteilungen beobachten, bevor die Zellen ihr Wachstum einstellten (2).

Für die Initiation der Zellteilung durch Anti-Ig oder Zellwandkomponenten gramnegativer Bakterien sind zusätzliche externe Signale notwendig (90,91). Akzessorische Zellen, darunter auch Makrophagen, interagieren mit dem Mitogen und werden zur Sekretion von löslichen Wachstumsfaktoren angeregt (92). Nach F. Melchers (2) scheinen von Helfer-T-Lymphozyten freigesetzte ß-Faktoren keine Rolle zu spielen. Die Mitogene sollen die Bildung dieser Faktoren in B-Lymphozyten induzieren. Alternativ soll durch die Bindung des polyklonalen Aktivators an die B-Lymphozytenoberfläche ein Molekülkomplex gebildet werden, der die Wirkung des Wachstumsfaktors imitiert und so das Proliferationssignal auslöst.

2. AUFGABENSTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mögliche molekulare Mechanismen der Aktivierung von B-Lymphozyten durch synthetische Analoga bakterieller Zellwandkomponenten zu analysieren. Dazu sollen zum einen spezifische Mitogenbindungsstellen für das dem N-Terminus von Lipoprotein analoge synthetische Lipopeptid TPP charakterisiert werden, zum anderen sollen biochemische Veränderungen untersucht werden, die durch die Bindung dieses Mitogens an die Zelloberfläche ausgelöst werden und die für den B-Lymphozyt möglicherweise ein Signal zur Proliferation und Differenzierung darstellen.

Anhand von Bindungsstudien soll die Zellspezifität verschiedener Immunzellen für Lipopeptide bestimmt und mit der biologischen Reaktionsfähigkeit dieser Zellen verglichen werden.
Am Beispiel der humanen promyeloischen Leukämielinie HL-60 soll gezeigt werden, daß TPP neben seiner bekannten Wirkung als polyklonaler B-Zell-Aktivator bei anderen Zelltypen weitere biologische Effekte auslöst.

Zum Nachweis der während der mitogenen Aktivierung von B-Lymphozyten neusynthetisierten cytoplasmatischen und membrangebundenen Proteine sollen Milzzellen mit (^{3}H)Leucin und mit (^{35}S)Methionin markiert werden. Da posttranslationelle Modifikationen von Proteinen deren Funktionszustand ändern, soll der Einfluß von TPP und LPS auf die Phosphorylierung und die Sulfatidierung von Membranproteinen untersucht werden. Die ruhenden oder voraktivierten Lymphozyten aus Nacktmäusen sowie Milzlymphozyten aus einem LPS-Nonresponder- und einem LPS-Responderstamm sollen mit (^{32}P)Orthophosphat bzw. (^{35}S)Sulfat markiert werden. Nach dem Solubilisieren der Zellen sollen die Membranproteine durch Erhöhung der Temperatur in der Detergensphase angereichert und durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden.

Da für eine Vielzahl biologisch wirksamer Substanzen die Hydrolyse von Polyphosphoinositlipiden eine wichtige Rolle bei der

Übertragung des Aktivierungssignals von der Plasmamembran ins Zellinnere spielt, soll dieser Stoffwechselweg als möglicher Mechanismus für die Aktivierung von B-Lymphozyten durch TPP untersucht werden. Ruhende Milzzellen sollen mit myo-(2-^{3}H)Inosit markiert werden. Nach Aktivierung der Zellen in Gegenwart von Lithiumchlorid sollen diese lysiert und die dabei freigesetzten inosithaltigen Verbindungen quantitativ über einen Anionenaustauscher und dünnschichtchromatographisch bestimmt werden.

Bindeproteine für TPP im Mausserum und von Lymphozyten sollen durch Affinitätschromatographie aufgetrennt werden. Hierbei dient das an CPG-gekoppelte Mitogen als Adsorbens. Die an der Affinitätssäule gebundenen ^{3}H-Leucin-markierten Proteine Lipopeptid-aktivierter Milzzellen sollen selektiv mit gelöstem TPP eluiert und durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden 8 - 10 Wochen alte Tiere beiderlei Geschlechts aus folgenden Inzuchtstämme verwendet:

Balb/c	SAVO-Ivanovas GmbH, Kisslegg, Deutschland
C3H/HeJ	Jackson Laboratories, Bar Harbor/Maine, USA
C57BL/6 (nu/nu)	Bomholtgaard, Ry, Dänemark
C57BL/6	Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg
C57BL/10.Sc.Cr	Institut für Immunbiologie, Freiburg

3.1.2 Zellinien, Primärzellen

BCL_1 Zellinie, die aus einem spontan entstandenen B-Zell-Tumor einer Balb/c-Maus etabliert wurde. Geschenk von W.O. Weigle, Dept. of Immunopathology, Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, USA.

EL-4 T-Zellinie, die aus einem Dimethylbenzanthren-induzierten Lymphom einer C57BL/6N-Maus etabliert wurde. Geschenk von S. Koch und G. Hämmerling, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ).

$P388D_1$ Eine von C.J. Dawe und M. Potter isolierte Makrophagen-ähnliche Zellinie (93). Geschenk von P. Walden, Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen.

P815 Zellinie aus einem spontan im DBA/2-Mausstamm entstandenen Mastocytom. Geschenk von S. Koch, DKFZ.

HL-60 Myeloide Zellinie aus einem Patienten mit akuter promyelozytärer Leukämie (94). Geschenk von F. Grunert, Institut für Immunbiologie, Freiburg.

J774 Makrophagenzellinie. Geschenk von M. Ferber, Max-Planck-Institut (MPI) für Immunbiologie, Freiburg.

Makrophagen	isoliert aus dem Knochenmark von C3H/HeJ-Mäusen von P. Hoffmann, Institut für Immunbiologie, Freiburg.

3.1.3 Mitogene, Antiseren

TPP	K.H. Wiesmüller, G. Jung, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen; MW: 1269,8 Da
Pam_3Cys-Ser-$Lys_4(FITC)_x$-OH x (4-x) CF_3COO^-	J. Metzger, G. Jung; MW: 2241,7 Da für x = 3
Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4$-OH x 4 CF_3COO^-	dto.; MW: 1852,8 Da
LPS aus S. abortus equi	isoliert von Ch. Galanos, MPI für Immunbiologie, Freiburg
Con A	Concanavalin A aus Canavalia ensiformis (Pharmacia, Schweden)
Lipoprotein aus E.coli B/r	isoliert von W. Scheuer, Arbeitsbereich Immunologie, Universität Tübingen
Kaninchen-anti-Maus IgM	Dianova, Hamburg
12/2/17	monoklonaler Maus-anti-CEA Antikörper. Geschenk von F. Grunert
Peroxidase-markiertes Kaninchen-anti-Maus Antiserum	Geschenk von F. Grunert (s.o)

3.1.4 Chemikalien

Amersham Buchler: Amplify, myo-(2-^{3}H)Inosit TRK.317, L-(4,5-^{3}H)Leucin TRK.170, ^{14}C-methyliertes Proteinstandardgemisch CFA.626, (^{32}P)Orthophosphat PBS.11, (^{35}S)Sulfat SJS.1, L-(^{35}S)Methionin SJ.204, (Methyl-^{3}H)Thymidin TRA.120
Gibco: Fungizone, Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml), BME Vitaminlösung (100x), BME Aminosäurelösung (50x), MEM nichtessentielle Aminosäurelösung (100x)
Flow: L-Glutamin
Fluka: 1-Hydroxy-benzotriazol

Fresenius: Plasmasteril
LKB: Ampholin pH 5-7, Ampholin pH 3.5-10
New England Nuclear: Enlightening, EN^{3}HANCE
Nyegaard: Lympho-Prep
Pharmacia: Percoll
Seromed: Trypanblau
Serva: Acrylamid, Bromphenolblau, CPG-Aminopropyl, Dowex-1x8-400, Natriumdodecylsulfat, N,N'-Methylenbis-acrylamid, Serva Blue G, TEMED, Triton X-100, Triton X-114
Shell Chemical Company: Nonidet P40
Sigma: 3,3'-Diaminobenzidin, L-α-Phosphatidylinosit, Phosphoinositphosphate, Rinderserumalbumin, Trizma Base
Zinsser: Quickzint 402, Quickzint 501

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von E. Merck, Darmstadt, bezogen.

3.1.5 Medien, Puffer

Basal Medium Eagle Diploid (BMED), modifiziert (Flow Lab.):
Pulvermedium mit L-Glutamin ohne Natriumhydrogencarbonat
Modifiziertes Iscove's Medium (Geschenk der Behringwerke, Marburg): supplementiert mit Albumin, Transferrin und Lipiden
RPMI-1640 (Gibco): mit 25 mM Hepes und 25 mM L-Glutamin
Minimal Essential Medium (MEM) (Flow Laboratories):
MEM Eagle (modifiziert) mit Hanks' Salzen, 20 mM Hepes-Puffer, ohne Natriumhydrogencarbonat, ohne L-Glutamin
RPMI-1640 ßPSG-Konzentrat:

100	ml RPMI-1640
20	ml L-Glutamin (200 mM)
10	ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 000 U/ml)
0,4	ml 2-Mercaptoethanolstammlösung

2-Mercaptoethanolstammlösung:
0,1 ml 2-Mercaptoethanol + 9,9 ml RPMI-1640
2-Mercaptoethanolstammlösung für Markierungsexperimente:
0,1 ml 2-Mercaptoethanol + 9,9 ml 150 mM NaCl

Zellkultivierungsmedium für Zellinien (Maus):

100 ml RPMI-1640
10 ml ßPSG-Konzentrat
11 ml FCS (30 min bei 56°C inaktiviert) (Boehringer)

Zellkultivierungsmedium für Zellinien (Mensch):

100 ml RPMI-1640
10 ml FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)
1 ml Fungizone

Zellkultivierungsmedium für Maus-Milzlymphozyten:

100,0 ml RPMI-1640
11,0 ml RPMI-1640 ßPSG-Konzentrat
3,8 ml FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)
1,0 ml Fungizone

PBS Dulbecco (Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung) ohne Ca- und Mg-Salze:

8,0 g/l NaCl
0,2 g/l KCl
0,2 g/l KH_2PO_4
1,15 g/l Na_2HPO_4

mit 1 N HCl pH 7.2 einstellen

3.1.6 Geräte

Aminosäureanalysator LC 6000 E (Biotronik)
Autoradiographie-Kassette Suprema (Goos, Heidelberg)
Blitzgerät V200 BC (Voigtländer)
CO_2-Brutschrank (Heraeus)
Costar Gewebekulturflaschen (Falcon Plastics)
Cytozentrifuge (Shandon)
Eppendorfzentrifuge Modell 5412 (Bachofer, Reutlingen)
Fraktionssammler Modell 1850 (Isco)
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen)
Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer FACS II (Becton Dickinson)
Geltrockner (Zabona, Basel, Schweiz)
Glasfiberfilter (Dynatech, Nürtingen)
Gradientenmischer (Hölzel, Dorfen)
Hamiltonspritze (Hamilton-Bonaduz, Schweiz)
Heizblock (Liebisch)
Homogenisator (Braun, Melsungen)
Magnetrührer (Gerhardt)
Mikroskop Modell IMT-2 (Olympus)
Mikrotiterplatten (Falcon Plastics)
Mikrowaage 4503 MP6 (Sartorius)
Netzgerät (Fischer, Heidelberg)
Neubauer Zählkammer (Assistent)
Nylongaze (Eckert & Cie, Waldkirch/Breisgau)
Peristaltische Pumpe P-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Schweden)
pH-Meter pH530 (Wissenschaftl.-Techn. Werkstätten, Weilheim)
Sterilfilter (Schleicher und Schüll, Dassel)
Szintillationszähler Modell MR 300 (Kontron, Oslo, Norwegen)
Ultraschallstab Labsonic 1510 (Braun, Melsungen)
Universalschuttelmaschine Modell KS-10 (Bühler, Tübingen)
Waage (Mettler, Zürich, Schweiz)
Zellerntegerät (Skatron, Oslo, Norwegen)
Zentrifuge Modell Minifuge T (Heraeus-Christ, Osterode)
Zentrifuge Modell Speed-Vac-Konzentrator (Bachofer, Reutlingen)

3.2 METHODEN

3.2.1 Allgemeine zelluläre Arbeitstechniken

3.2.1.1 Kultivieren und Waschen der Immunzellen

Lymphozyten, Thymozyten und die Maus-Tumorzellinien wurden bei 37°C in einem CO_2-Inkubator mit 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert, die humane Leukämiezellinie HL-60 mit 10% CO_2. Die Zellen wurden, falls nicht anders beschrieben, durch mehrmaliges Abzentrifugieren (10 min/250 x g/4°C) und Resuspendieren in MEM gewaschen.

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Tumorzellen

Alle verwendeten Tumorzellinien konnten in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und bei Bedarf wieder kultiviert werden.

Lösungen:
Einfriermedium:
10% Dimethylsulfoxid
90% FCS
Kulturmedium für Zellinien:
siehe 3.1.5

Durchführung:
Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schütteln der Kulturflüssigkeit von der Gefäßwand abgelöst und nach dem Transfer in ein Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Etwa 5 x 10^6 Zellen wurden in ca. 1 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und in sterile Einfrierröhrchen überführt. Um eine lineare Temperaturabnahme beim Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Röhrchen in einem dickwandigen Styroporbehälter 24 h bei -70°C belassen. Danach wurde die Probe in flüssigem Stickstoff gelagert.
Die eingefrorenen Ampullen wurden schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, bis sich die gefrorene Zellsuspension von der Ge-

fäßwand gelöst hatte. Nach Transfer in ein 15 ml-Röhrchen wurden 4 ml warmes Kulturmedium innerhalb von 30 s hinzugefügt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit Medium gewaschen und in Kultur genommen. Die Ausgangszelldichte betrug etwa 5 x 10^6 Zellen/30 ml. Alle drei Tage wurden die Kulturen auf die ursprüngliche Zelldichte verdünnt. Geerntet wurden die Tumorzellen grundsätzlich in der exponentiellen Wachstumsphase.

3.2.1.3 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau (4,4'-Bis(8-amino-3,6-disulfo-1-hydroxy-2-naphthylazo)-3,3'-dimethylbiphenyl-Na_4-Salz) benutzt, der tote oder stark geschädigte Zellen blau anfärbt (95). Um Zählfehler zu vermeiden, wurden die Erythrozyten vorher lysiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit demselben Volumen 0,6%iger Essigsäure (in 150 mM NaCl) versetzt und im Verhältnis 1:2 mit einer 0,16%igen Trypanblaulösung (in 150 mM NaCl) auf etwa 10^6 Zellen pro ml verdünnt. Ungefärbte Zellen wurden innerhalb von 5 min unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.2.2 Stimulationsexperimente

3.2.2.1 Präparation der Milzzellen

Lösungen:
Kulturmedium für Milzzellen:
siehe 3.1.5
Modifiziertes Iscove's Medium:
siehe 3.1.5

Durchführung:
Die Milz einer kurz vor der Organentnahme durch cervikale Dislokation getöteten Maus wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und nach Zugabe von 10 ml MEM in einem Glaspotter unter

Kühlung homogenisiert. Um Bindegewebsreste abzutrennen, wurde das Homogenat über Watte filtriert, zentrifugiert und zweimal gewaschen. Die Zellen wurden entweder in einem serumhaltigen Kulturmedium mit 2-Mercaptoethanol (96) resuspendiert oder in serumfreiem Iscove's Medium und auf eine Dichte von 4,5 x 10^6/ ml eingestellt.

3.2.2.2 Vorbereitung der Mitogene

Von den einzelnen Mitogenen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml angesetzt und in einer 1:4 Verdünnungsreihe zu den Zellen gegeben. Lipopeptide wurden durch Beschallung (Ultraschallstab, 100 W, 5 x 20 s) in MEM/3,3% FCS oder in serumfreiem Iscove's Medium unter Zusatz von 0,01 mol Triton X-100/mol Mitogen suspendiert. LPS und Con A brauchten aufgrund ihrer guten Löslichkeit nicht beschallt zu werden.

3.2.2.3 Stimulationstest (19)

Je 0,133 ml der Milzzellsuspension wurden in Mikrotiterplatten (flacher Boden, Falcon Nr. 3040) mit 50 µl der verschiedenen Mitogenverdünnungsstufen versetzt und 24 h aktiviert. Die Endkonzentration der Zellen betrug 3,3 x 10^6/ml. Nach Zugabe von 25 µl (22 kBq bzw. 0,625 µCi) einer (^{3}H)Thymidinlösung (spezifische Aktivität 185 GBq = 5 Ci/mmol) wurden die Kulturen weitere 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Einfrieren (-20°C) und Auftauen lysiert. Zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität wurden die unlöslichen Zellbestandteile einschließlich der markierten DNA mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Glasfiberfilter transferiert. Die Filterplättchen wurden 1 h bei 70°C getrocknet und mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

3.2.3 Bindungsstudien mit Fluorescein-markiertem Lipopeptid

3.2.3.1 Markierung von Tumorzellen

Lösungen:

Markierungslösung I:

0,2 mg/ml FITC-markiertes Lipopeptid in MEM/0,04% Natriumazid/0,001% Triton X-100

Markierungslösung II:

Markierungslösung I ohne Natriumazid

Waschpuffer:

PBS mit 1% Albumin/0,04% Natriumazid

Durchführung:

Die Tumorzellen wurden nach dem Abzentrifugieren aus dem Kulturmedium dreimal mit MEM gewaschen, um die an der Zelloberfläche adsorbierten Proteine zu entfernen. Je 1,5 x 10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen $Pam_3Cys\text{-}Ser\text{-}(Lys)_4\text{-}(FITC)_{2\text{-}4}\text{-}OH$ (Lösung I) versetzt (Gesamtvolumen 1 ml), 30 min auf Eis inkubiert, anschließend abzentrifugiert und zweimal mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurden sie in 0,3 dieses Puffers resuspendiert und bis zur Analyse auf Eis aufbewahrt. Um die Verteilung des markierten Lipopeptids nach der Bindung an die Zelloberfläche zu untersuchen, wurden die Tumorzellen mit 0,25 ml Lösung II (0,05 mg/ml Lipopeptid; 1 ml-Kultur) versetzt und 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder in Waschpuffer resuspendiert und bei 4^oC aufbewahrt oder in MEM/5% FCS bei 37^oC kultiviert.

3.2.3.2 Markierung von Milz- und Thymuszellen

Milz- und Thymuszellen wurden wie in 3.2.2.1 beschrieben präpariert und nach der spezifischen Lyse der Erythrozyten (siehe 3.2.5.1) proteinfrei gewaschen. Je 1,5 x 10^6 Zellen wurden analog 3.2.3.1 markiert und aufgearbeitet.

3.2.3.3 Analyse der Lipopeptid-markierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop

Die Zellen wurden nach der Inkubation mit dem FITC-markierten Lipopeptid unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Intensität und die Verteilung der Fluoreszenz auf der Zelle wurden bewertet.

3.2.3.4 FACS-Analyse der Lipopeptid-markierten Tumorzellen

Die relative Fluoreszenzintensität der einzelnen Tumorzellen wurde mit einem FACS II bestimmt (97). Mit diesem Gerät kann man Zellen aufgrund ihrer charakteristischen Lichtstreuung und ihrer Fluoreszenz unterscheiden.

Durchführung:
Zur zusätzlichen Unterscheidung von toten und vitalen Zellen wurden die markierten Zellen mit 0,005 mg/ml Propidiumjodid versetzt, das nur in tote und absterbende Zellen eindringt und bei Bestrahlung die Zellkerne rot färbt. Es wurden jeweils etwa 10 000 vitale Zellen analysiert.
Die Auswertung erfolgte durch ein Histogramm, bei dem auf der Abzisse die relative Fluoreszenzintensität und auf der Ordinate die Zellzahl aufgetragen wurden.

3.2.4 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Differenzierung der humanen promyeloischen Leukämiezellinie HL-60

3.2.4.1 Kultivierung der Leukämiezellinie HL-60

Die Tumorzellen wurden bei Raumtemperatur vom Kulturmedium abzentrifugiert und einmal gewaschen. Jeweils 2 x 10^5 Zellen wurden in 1,5 ml Kulturmedium resuspendiert und mit folgenden Sub-

stanzen versetzt: 10, 50 und 100 µg/ml TPP; 0.1, 5 und 30 µg/ml LPS; 1,25% Dimethylsulfoxid. In 24-Lochplatten wurden die Zellen jeweils 1, 3, 5 und 7 Tage kultiviert. Bei den 5-Tage- und 7-Tage-Kulturen wurde nach 3 und 5 Tagen das Medium einschließlich der Zusätze erneuert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen transferiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zahl der vitalen Zellen durch Trypanblau-Ausschlußfärbung bestimmt.

3.2.4.2 Isolierung humaner Granulozyten aus peripherem Blut

Lösungen:

Percoll-Stammlösung:

9 Teile Percoll (Dichte 1,13 g/ml; Werksangabe) und 1 Teil Eagle's Medium (10-fach konzentriert). Resultierende Dichte: 1,11 g/ml

Percollstufengradient:

Dichte 1,09 g/ml: 6,15 ml Stammlösung und 1,85 ml MEM

Dichte 1,07 g/ml: 4,79 ml Stammlösung und 3,21 ml MEM

Durchführung:

Peripheres Blut eines gesunden Spenders (30-40 ml) wurde im Verhältnis 6:1 mit 19%igem Natriumcitrat versetzt, um eine Gerinnung zu verhindern. Durch Zusatz von 40 ml Plasmasteril, einem dextranhaltigen Plasmaexpander, sedimentierte der größte Teil der Erythrozyten. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand zentrifugiert (5 min, 350 x g, Raumtemperatur) und das Zellpellet in 2 ml PBS suspendiert. Die Auftrennung der verschiedenen Zellpopulationen erfolgte in einem diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten: In einem Zentrifugenröhrchen wurden je 8 ml Percollösung mit einer Dichte von 1,11 g/ml, 1,09 g/ml und 1,07 g/ml nacheinander überschichtet, und nach dem Auftragen der Zellsuspension auf den Gradienten wurde 30 min zentrifugiert (700 x g, Raumtemperatur, ohne Bremse). Die in der mittleren Bande befindlichen Granulozyten wurden mit einer Pasteurpipette aufgenommen und zweimal mit PBS gewaschen.

3.2.4.3 Färbung der Zellen nach Pappenheim

Die Färbung nach Pappenheim (98) eignet sich besonders gut zur Darstellung von Leukozyten. Dabei werden die Zellen zuerst mit May-Grünwald-Lösung, dann mit Giemsa-Lösung gefärbt.

Lösungen:
May-Grünwald's Eosin-Methylenblau-Lösung
Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung

Durchführung:
Etwa 40 000 bis 50 000 Zellen wurden mit Hilfe einer Cytozentrifuge auf einen Objektträger transferiert (3 min, 500 Umdrehungen/min). Das luftgetrocknete Präparat wurde 3-5 min mit 0,5 ml May-Grünwald-Lösung fixiert und anschließend mit der gleichen Menge dest. Wassers versetzt, da erst in dieser Lösung die Färbung der Zellen erfolgt. Nach 5 min wurde die Färbelösung abgegossen und das Präparat 20 min mit verdünnter Giemsa-Lösung (0,27 ml in 10 ml bidest. Wasser) gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch gründliches Waschen mit dest. Wasser entfernt.

3.2.4.4 Immunhistologische Charakterisierung der Zellen

Die morphologisch veränderten Zellen sollten zusätzlich immunhistologisch untersucht werden. Da Granulozyten im Gegensatz zu Promyelozyten auf ihrer Oberfläche das NCA (mit dem carcinoembryonalen Antigen kreuzreagierendes Antigen) exprimieren, wurden die Zellen auf NCA-Expression untersucht. Andere spezifische Antikörper für die verschiedenen Differenzierungsstufen standen nicht zur Verfügung.

Lösungen:
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS):
150 mM NaCl/50 mM Tris-HCl, pH 7.2

Anti-CEA Lösung:

0,013 ml Ascitesflüssigkeit (monoklonaler Maus-anti-CEA Antikörper 12/2/17) und 0,065 ml Schweineserum in 4 ml TBS

Peroxidase-markiertes Kaninchen-anti-Maus Antiserum:

0,2 ml Antiserum in 8 ml TBS

Färbelösung:

vor Gebrauch 5 mg 3,3'-Diaminobenzidin in 7 ml TBS lösen und mit 0,1 N NaOH auf pH 7.2 einstellen, dann 10 µl 30%-iges H_2O_2 zusetzen

Durchführung:

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Zellen 30 min mit 0,2 ml einer einer 1%igen H_2O_2-Lösung (in 100% Methanol) versetzt. Nach dem Waschen mit TBS (jeweils 5 min) wurden sie 30 min mit 0,2 ml einer 5%igen Ovalbuminlösung (in TBS) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Die Zellen wurden zweimal mit TBS gewaschen und danach 30 min mit 0,2 ml anti-CEA Antikörperlösung versetzt. Bei den Kontrollen wurden die Maus-anti-CEA Antikörper durch normales Mausserum ersetzt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 0,2 ml Peroxidase-markiertem Antiserum versetzt und 30 min damit inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt. Zur spezifischen anti-CEA-Färbung wurden die Zellen 5-10 min mit 0,2 ml Färbelösung versetzt. Zuletzt wurden die Präparate zweimal mit Wasser gewaschen. Zur Gesamtfärbung wurden die Zellen 2 min mit Hämalaun gefärbt und danach gründlich mit dest. Wasser gewaschen.

3.2.5 Metabolische Markierung von Lymphozytenproteinen

3.2.5.1 Präparation der Milzzellen

Lösungen:
Lysispuffer:
Lösung A 0,16 M NH_4Cl: 8,3 g/l
Lösung B 0,17 M Tris-HCl, pH 7.2: 20,6 g/l
vor Gebrauch 0,9 ml von A und 0,1 ml von B mischen

Durchführung:
Die Milzzellen wurden in kaltem MEM durch Nylongaze gepreßt (Maschenweite 0,1 mm) und so weitgehend vom Bindegewebe abgetrennt. Das Filtrat wurde zentrifugiert und das Pellet zur Entfernung der Erythrozyten in 1 ml Lysispuffer resuspendiert (95). Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 40 ml MEM versetzt und danach zweimal gewaschen.

3.2.5.2 Präparation ruhender B-Lymphozyten

Lösungen:
100% Percoll: 9 Teile Percoll (Dichte 1,128; Werksangabe) und 1 Teil 10x PBS, pH 7.2; pro 100 ml Lösung 0,15 ml 2 N HCl zusetzen. Resultierende Dichte: 1,119 g/ml
70% Percoll: 7 Teile 100%iges Percoll und 3 Teile 1x PBS; resultierende Dichte: 1,086 g/ml
60% Percoll: 6 Teile 100%iges Percoll und 4 Teile 1x PBS; resultierende Dichte: 1,075 g/ml
50% Percoll: 5 Teile 100%iges Percoll und 5 Teile 1x PBS; resultierende Dichte: 1,064 g/ml
40% Percoll: 4 Teile 100%iges Percoll und 6 Teile 1x PBS; resultierende Dichte: 1,053 g/ml

Durchführung:
Die Milzzellen einer Nacktmaus (C57Bl/6 nu/nu) wurden in MEM mit einem Spatel aus dem Bindegewebssack gepreßt und zu Einzel-

zellen suspendiert. Nach Abtrennung des Bindegewebes wurden die verschiedenen Zellpopulationen in einem diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten (40%, 50%, 60%, 70%, 100%) aufgetrennt (99): Die Zellen wurden in 100%igem Percoll suspendiert (etwa 5 x 10^7/ml), und 2 ml der Zellsuspension wurden mit je 2 ml 70%iger, 60%iger, 50%iger und 40%iger Percollösung überschichtet und 30 min zentrifugiert (4°C, 700 x g). Die ruhenden, kleinen Lymphozyten, die sich in der Phasengrenzschicht zwischen der 60%igen und 70%igen Percollösung befanden (100), wurden mit einer Pipette aufgenommen und zweimal gewaschen. Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Ausschlußfärbung nach 3.2.1.3 bestimmt.

3.2.5.3 Präparation aktivierter B-Lymphozyten

B-Lymphoblasten lassen sich anreichern, indem die kleinen, ruhenden Lymphozyten einer Nacktmaus durch Zusatz eines B-Zell-Mitogens mehrere Tage polyklonal aktiviert werden.

Durchführung:
Die nach 3.2.5.2 präparierten Milzzellen von Nacktmäusen wurden in Zellkulturmedium suspendiert und auf eine Zelldichte von 2 x 10^6/ml eingestellt. Nach Zugabe von 0,01 mg/ml TPP bzw. 0,025 mg/ml LPS wurden die Lymphozyten 40 h in 50 ml-Kulturflaschen aktiviert. Die lebenden Zellen, hauptsächlich TPP- bzw. LPS-Blasten, wurden durch Dichtezentrifugation mit Lympho-Prep von den toten Zellen abgetrennt: In Zentrifugenröhrchen wurden je 4 ml Lympho-Prep (Dichte 1,077 g/ml) gegeben, mit je 5 ml Zellsuspension (in MEM, 1 x 10^7 Zellen/ml) vorsichtig überschichtet und 20 min zentrifugiert (4°C, 700 x g). Die sichtbare Bande an der Phasengrenzschicht enthielt die lebenden Zellen, die mit einer Pasteurpipette aufgenommen und zweimal gewaschen wurden. Tote Zellen befanden sich aufgrund ihrer größeren Dichte im Sediment (95).

3.2.5.4 Markierung aktivierter Milzzellen mit (^{3}H)Leucin

Um vor allem Proteine proliferierender B-Lymphozyten zu markieren, wurden Milzzellen mit der optimalen Mitogenkonzentration voraktiviert und anschließend mit (^{3}H)Leucin markiert.

Lösungen:
Zellmarkierungsmedium:

100,0	ml	MEM (Eagle) mit Earl's Salzen, mit L-Glutamin ohne L-Leucin (Gibco)
0,01	mg/ml	TPP bzw. 0,04 mg/ml LPS in 150 mM NaCl
3,8	ml	FCS (30 min bei 56°C inaktiviert; dialysiert gegen 150 mM NaCl; steril filtriert)
2,3	ml	200 mM L-Glutamin
0,85	ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 000 U/ml)
0,04	ml	2-Mercaptoethanolstammlösung

Durchführung:
Die nach 3.2.5.1 isolierten Milzzellen von Balb/c-Mäusen wurden entweder in serumfreiem Iscove's Medium oder in serumhaltigem Kulturmedium (siehe 3.1.5) aufgenommen und nach Zusatz von 0,01 mg/ml TPP bzw. 0,04 mg/ml LPS bei einer Zelldichte von 3,3 x 10^6/ml in der Regel 24 h aktiviert. Die Zellen wurden danach zweimal mit leucinfreiem MEM gewaschen, in Zellmarkierungsmedium resuspendiert und nach Zugabe von 27,72 GBq (0,75 mCi) (^{3}H)Leucin (spezifische Aktivität 1998 GBq/mol = 54 Ci/mol) pro 2 bis 4 x 10^8 Zellen weitere 24 h kultiviert. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen.

3.2.5.5 ^{32}P-Orthophosphatmarkierung aktivierter B-Lymphozyten

Die Phosphorylierung von Membranproteinen spielt bei der Aktivierung und Teilung von Zellen eine wichtige Rolle. Da ruhende B-Lymphozyten sich durch TPP und LPS aktivieren lassen, sollten die spezifisch unter der Wirkung dieser Substanzen synthetisierten Phosphoproteine nachgewiesen werden.

Durchführung:

Markierungsmedium: MEM-Hank-Medium ohne Phosphatsalze

$CaCl_2$	140 mg/l
KCl	400 mg/l
$MgSO_4$	97 mg/l
NaCl	8000 mg/l
BME-Vitaminlösung (100x)	10 ml/l
MEM-Aminosäurelsg. (50x)	20 ml/l
MEM-Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	10 ml/l
Glucose	1000 mg/l
Phenolrot	10 mg/l
L-Glutamin 200 mM	10 ml/l
FCS (dialysiert gegen 150 mM NaCl)	52 ml/l
Penicillin-Streptomycin-Lsg. (10 000 U/ml)	7 ml/l
Hepes, pH 7.2	20 mmol/l
2-Mercaptoethanol	50 µmol/l

Durchführung:

Die nach 3.2.5.2 präparierten ruhenden B-Lymphozyten wurden zweimal mit phosphatfreiem Medium gewaschen. Je 2 bis 12 x 10^6 Zellen wurden in 1 ml dieses Mediums suspendiert und in 24-Loch-Kulturplatten nach Zugabe von 0,01 mg/ml TPP bzw. 0,025 mg/ml LPS (in 150 mM Nacl) 15 min im Brutschrank voraktiviert. Anschließend wurden 74 MBq (0,2 mCi; in 0,1 ml verdünnter HCl, pH 2-3) (^{32}P)Orthophosphat und 0,1 ml 100 mM Natriumhydrogencarbonat hinzugefügt. Nach 4 h Gesamtinkubation wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen transferiert. Aktivierte Lymphozyten, die fest an der Kunststoffunterlage hafteten, ließen sich durch Zusatz von 0,5 ml PBS/10 mM EDTA ablösen. Die markierten Zellen wurden zweimal mit je 4 ml MEM gewaschen.

3.2.5.6 ^{32}P-Orthophosphatmarkierung von B-Lymphoblasten und aktivierten Milzzellen

Je 1 bis 4 x 10^6 angereicherte B-Lymphoblasten bzw. aktivierte Milzzellen wurden mit Mitogen voraktiviert und nach Zugabe von

74 MBq (^{32}P)Orthophosphat insgesamt 4 h inkubiert. Die markierten Zellen wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet.

3.2.5.7 ^{35}S-Methioninmarkierung aktivierter B-Lymphozyten

Lösungen:
Markierungsmedium:

100,0	ml methioninfreies Medium (Seromed)
5,2	ml FCS (inaktiviert; dialysiert gegen 150 mM NaCl)
1,0	ml L-Glutamin 200 mM
0,8	ml Penicillin-Streptomycin-Lsg. (10 000 U/ml)
0,04	ml 2-Mercaptoethanolstammlösung

Durchführung:
Die nach 3.2.5.2 isolierten ruhenden B-Lymphozyten wurden zweimal mit methioninfreiem Medium gewaschen und zuletzt in Markierungsmedium resuspendiert. 1 ml-Kulturen mit 2 x 10^6 Zellen wurden nach Zusatz von 0,01 mg/ml TPP bzw. 0,025 mg/ml LPS 15 min bei 37°C vorinkubiert. Nach Zusatz von je 74 MBq (0,2 mCi) (^{35}S)Methionin wurden die Zellen 4 h oder 8 h markiert und danach wie in 3.2.5.5 beschrieben aufgearbeitet.

3.2.5.8 ^{35}S-Methioninmarkierung von B-Lymphoblasten und aktivierten Milzzellen

Je 1 bis 2 x 10^6 B-Lymphoblasten bzw. aktivierte Milzzellen wurden in 1 ml-Kulturen nach Mitogenvoraktivierung mit 74 MBq (^{35}S)Methionin versetzt, 4 h im Brutschrank inkubiert und danach wie in 3.2.5.5 beschrieben aufgearbeitet.

3.2.5.9 ^{35}S-Sulfatmarkierung von B-Lymphoblasten und aktivierten Milzzellen

Lösungen:

Markierungsmedium ohne Sulfatsalze:

$CaCl_2$	140 mg/l
KCl	400 mg/l
KH_2PO_4	60 mg/l
$MgCl_2$	98 mg/l
Na_2HPO_4	48 mg/l
NaCl	8000 mg/l
BME-Vitaminlösung (100x)	10 ml/l
MEM-Aminosäurelsg. (50x)	20 ml/l
MEM-Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	10 ml/l
Glucose	1000 mg/l
Phenolrot	10 mg/l
L-Glutamin 200 mM	10 ml/l
FCS (dialysiert gegen 150 mM NaCl)	52 ml/l
Penicillin-Streptomycin-Lsg. (10 000 U/ml)	7 ml/l
Hepes, pH 7.2	20 mmol/l
2-Mercaptoethanol	50 µmol/l

Durchführung:

Die nach 3.2.5.3 präparierten B-Lymphoblasten bzw. aktivierten Milzzellen wurden zweimal mit je 5 ml Markierungsmedium gewaschen, um freie Sulfationen zu entfernen. Je 1 bis 4 x 10^6 Zellen wurden in 1 ml MEM-Hank-Medium ohne Sulfatsalze suspendiert und in 24-Loch-Kulturplatten voraktiviert. Anschließend wurden 74 MBq (0,2 mCi) (^{35}S)Sulfat und 0,1 ml 100 mM Natriumhydrogencarbonat hinzugefügt. Nach 4 h Gesamtinkubation wurden die Zellen wie in 3.2.5.5 beschrieben aufgearbeitet.

3.2.6 Präparation der markierten Lymphozytenproteine

3.2.6.1 Solubilisierung durch Nonidet P40 (101)

Lösungen:
Solubilisierungspuffer:

0,01 M Tris-HCl, pH 7.2
0,15 M NaCl
0,50 % Nonidet P40
0,02 % Natriumazid
0,001 M PMSF (100 mM in 2-Propanol; frisch zusetzen)

Durchführung:
Die ^{3}H-Leucin-markierten Milzzellen (Balb/c) wurden in Solubilisierungspuffer suspendiert (0,1 ml/10^{7} Zellen) und 15 min auf Eis gestellt. Nicht lysierte Zellen, Zellkerne sowie detergensunlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (27000 x g, 4°C, 10 min,). Der Überstand wurde bei -20°C bis zum Auftrag auf die Affinitätssäule eingefroren. Zur Bestimmung der Markierungsausbeute wurde von einem Aliquot des Solubilisats die Radioaktivität gemessen. Für die zweidimensionale gelelektrophoretische Analyse der ^{3}H-Leucin-markierten Zellproteine wurden 60 µl des Solubilisats mit 60 mg Harnstoff, 4 µl 2-Mercaptoethanol und 6 µl Ampholin (pH 3,5 - 10) versetzt.

3.2.6.2 Anreicherung der markierten Membranproteine mit Triton X-114

Lösungen:
Lysepuffer I:

0,150 M NaCl
0,010 M Tris-HCl, pH 7.4
0,001 M $CaCl_2$
0,001 M $MgCl_2$
0,001 M PMSF

Lysepuffer II:

Puffer I mit 1% Triton X-114

Sucroselösung:

7% Sucrose in Lysepuffer II

10% Triton X-114 in 0,010 M Tris-HCl, pH 7.4/0,15 M NaCl

IEF-Probenpuffer:

siehe 3.2.7.1

Durchführung:

Die ^{32}P- bzw. ^{35}S-markierten Zellen wurden nach dem Waschen in 0,6 ml kaltem Lysepuffer I suspendiert und 3 min inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl einer 10%igen Triton X-114-Lösung wurde das Zellysat zentrifugiert (15 min, 4°C, 13 000 x g, Eppendorfzentrifuge), um nicht lysierte Zellen, Zellkerne sowie detergensunlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand (Gesamtlysat) wurde abgenommen, das Pellet verworfen. 0,5 ml des Gesamtlysats wurden auf ein Sucrosekissen (50 µl) geschichtet und 5 min auf 37°C erwärmt, wobei die Lösung trüb wurde. Nach dem Zentrifugieren (3 min, 37°C, 13 000 x g, Eppendorfzentrifuge) wurden das Cytosol und die Sucroselösung vorsichtig abgenommen. Die am Boden des Röhrchens als gelber, öliger Tropfen sichtbare Membranfraktion (102) wurde mit 70 µl IEF-Probenpuffer versetzt und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Von einem Aliquot wurde die Markierungsausbeute bestimmt.

3.2.7 Analyse radiomarkierter Lymphozytenproteine durch ein- und zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

3.2.7.1 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Die radioaktiv markierten Zellproteine und die mit Triton X-114 angereicherten Membranproteine wurden durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. In engen zylin-

drischen Gelen wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt separiert, und nach dem Transfer dieser Rundgele auf SDS-Flachbettgele erfolgte eine Auftrennung nach der relativen Molekülmasse (103,104).

Lösungen:

IEF-Probenpuffer:		Endkonzentration
Harnstoff	28,50 g	9,5 M
Nonidet P40	1,00 g	2,0 % (w/v)
2-Mercaptoethanol oder	2,50 ml	5,0 %
Dithioerythrit	1,25 g	2,5 %
Ampholin pH 5-7	2,00 ml	1,6 %
Ampholin pH 3.5-10	0,50 ml	0,4 %
bidest. Wasser	ad 50,00 ml	

Überschichtungspuffer:		Endkonzentration
Harnstoff	13,52 g	9,0 M
Ampholin pH 5-7	0,50 ml	0,8 %
Apholin pH 3.5-10	0,25 ml	0,2 %
bidest. Wasser	ad 25,00 ml	

IEF-Acrylamid:		Endkonzentration
Acrylamid	2,838 g	28,38%
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,162 g	1,62%
bidest. Wasser	ad 10,00 ml	

10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Elektrodenpuffer:

10 mM Phosphorsäure

20 mM Natriumhydroxid

SDS-Probenpuffer:		Endkonzentration
Tris-Base	3,78 g	62,5 mM
Natriumdodecylsulfat	11,5 g	2,3 %
Glycerin	50,0 g	10,0 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	25,0 ml	5,0 %
bidest. Wasser	ad 500,0 ml	pH 6.8

AA-Stammlösung:		
Acrylamid	29,2 g	
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,8 g	
bidest. Wasser	ad 100,0 ml	filtrieren

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris-HCl, pH 8.9, 0,4% SDS

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/HCl, pH 6.8, 0,4% SDS

SDS-Laufpuffer:

0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS

3.2.7.1.1 Erste Dimension: Isoelektrische Focussierung

Durchführung:

Die Zusammensetzung der Gele ist aus der unteren Tabelle ersichtlich. Die Gellösung wurde in Glaskapillaren (Gesamtlänge 180 mm, Durchmesser 1,5 mm, Gellänge 130 mm), deren untere Enden mit Parafilm verschlossen waren, blasenfrei eingefüllt und mit 20 ul Überschichtungspuffer bedeckt. Die untere Elektrophorekammer wurde mit 10 mM H_3PO_4 gefüllt, die obere mit 20 mM NaOH. Zur Entfernung des Ammoniumperoxodisulfats wurde an die Gele für mindestens 30 min eine Spannung von 400 V (Anode untere Kammer) angelegt; danach wurde der Überschichtungspuffer abgesaugt. 60 bis 100 µl der Proteinprobe (in mindestens dem zweifachen Volumen IEF-Probenpuffer) wurden aufgetragen und mit 20 µl Überschichtungspuffer bedeckt. Die Elektrophorese erfolgte 16 bis 18 h bei einer konstanten Spannung von 400 V, anschließend 1 h bei 1000 V. Die Gele wurden aus den Kapillaren gepreßt, am unteren Ende mit Tusche markiert und in 3 ml kaltem SDS-Probenpuffer aufgenommen. Danach wurden sie entweder 15 min bei 4°C äquilibriert und dann sofort auf das SDS-Gel für die 2. Dimension gebracht oder bei -70°C eingefroren.

Tab. 1: Zusammensetzung des IEF-Gels

Anzahl der Gele	8	12
Harnstoff	2,3 g	3,45 g
IEF-Acrylamid	532 µl	798 µl
10% Nonidet P40	800 µl	1200 µl
Ampholin pH 5-7	150 µl	225 µl
Ampholin pH 3.5-10	100 µl	150 µl
bidest. Wasser	750 µl	1125 µl
leicht erwärmen, bis der Harnstoff gelöst ist, und durch ein 0,45 um-Filter filtrieren; danach:		
10% APS	2,5 µl	4 µl
TEMED	4,0 µl	6 µl

3.2.7.1.2 Messung des pH-Gradienten

Das IEF-Gel wurde in 5 mm lange Stücke geschnitten, die anschließend mit jeweils 2 ml entgastem bidest. Wasser versetzt wurden. Nach 5 bis 10 min wurde der pH mit einer pH-Elektrode bestimmt.

3.2.7.1.3 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Flachbettgele)

Lösungen:
Fixierlösung:
450 ml Ethanol
450 ml bidest. Wasser
100 ml Eisessig

Durchführung:
Die SDS-Flachbettgele (180 mm x 170 mm x 1,5 mm) bestanden aus einem Trenngel mit 11,5% Acrylamid und einem Sammelgel mit 4,4% Acrylamid. Die Zusammensetzung der Lösungen kann Tab. 2 und Tab. 3 entnommen werden. Die Trenngellösung wurde 13,5 cm hoch zwischen die abgedichteten Glasplatten eingefüllt und mit bidest. Wasser überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde das Wasser abgesaugt, das Sammelgel bis zur Oberkante der Gelplatten gegossen und die Gellösung mit Wasser-gesättigtem n-Butanol überschichtet. Das Butanol wurde anschließend durch gründliches Waschen mit bidest. Wasser entfernt und das äquilibrierte bzw. aufgetaute IEF-Gel luftblasenfrei auf das Sammelgel gelegt. Die Elektrophoresekammern wurden mit SDS-Laufpuffer gefüllt, ohne daß beim Füllen der oberen Kammer die aufgelegten IEF-Rundgele aufschwammen. Bis zum Eindringen der Probe in das Gel wurde eine Spannung von 200 V (Anode unten) angelegt. Als Molekularmassenmarker wurden 20 µl (20 nCi) eines ^{14}C-methylierten Proteinstandardgemisches aufgetragen. Bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel dauerte die Elektrophorese etwa 3 h. Danach wurden die Gele mindestens 1 h fixiert.

Tab. 2: Zusammensetzung des Trenngels

Anzahl der Gele	1	6	10
Trenngelpuffer	7,12 ml	42,8 ml	71,3 ml
AA-Stammlösung	10,90 ml	65,6 ml	109,3 ml
bidest. Wasser	10,32 ml	62,0 ml	103,5 ml
	Lösung entgasen		
10% APS	106 µl	638 µl	1063 µl
TEMED	13 µl	80 µl	134 µl

Tab. 3: Zusammensetzung des Sammelgels

Anzahl der Gele	1	6	10
Sammelpuffer	1,56 ml	9,4 ml	15,6 ml
AA-Stammlösung	0,94 ml	5,6 ml	9,4 ml
bidest. Wasser	3,75 ml	22,5 ml	37,5 ml
	Lösung entgasen		
10% APS	9,0 µl	53,2 µl	88,8 µl
TEMED	4,5 µl	26,7 µl	44,5 µl

3.2.7.2 Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

3.2.7.2.1 Herstellung des Flachbettgradientengels

Zur Charakterisierung ^{3}H-Leucin-markierter Lymphozytenbindeproteine für das synthetische Lipopeptid TPP wurden die affinitätschromatographisch angereicherten Proteine (3.2.9.3) in einem SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt (105).

Lösungen:
siehe 3.2.7.1

Durchführung:
Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels (180 mm x 170 mm x 1,5 mm) kann Tab. 4 entnommen werden. Das Trenngel bestand aus einem exponentiellen Gradienten von 10 bis 20% Acrylamid. In die hintere Kammer eines Zweikammermixers wurden 12,6 ml der 10%igen Lösung gefüllt, in die vordere Kammer 5,4 ml der 20%-igen. Nach Vorlauf von 1 ml wurde die vordere Kammer mit einem Stopfen verschlossen und mittels einer Kanüle der Druck ausgeglichen, so daß nach dem Entfernen der Kanüle das Volumen der Gellösung konstant blieb. Der Verbindungshahn zwischen beiden

Kammern wurde geöffnet, und mit einem Magnetrührer wurde die Mischung intensiv gerührt. Das Trenngel polymerisierte innerhalb von 4 h. Danach wurde das Sammelgel (5,5% Acrylamid) wie oben beschrieben gegossen.

Tab. 4: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Reagens	Volumen		
	10% Lösung	20% Lösung	5,5% Lösung
Trenngelpuffer	4,00 ml	1,80 ml	--
Sammelgelpuffer	--	--	1,20 ml
AA Stock	5,50 ml	5,00 ml	0,75 ml
bidest. Wasser	6,90 ml	--	3,00 ml
Glycerin 75 % aq.	--	0,60 ml	--
	Lösungen entgasen		
TEMED	10 µl	5 µl	5 µl
APS 10 %	22 µl	16 µl	15 µl
SDS 10 %	165 µl	75 µl	50 µl

3.2.7.2.2 Vorbehandlung der Proben

Lösungen:

SDS-Probenpuffer (2x):		Endkonzentration
Tris-Base	7,56 g	125,0 mM
Natriumdodecylsulfat	23,00 g	4,6 %
Glycerin	100,00 g	20,0 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	50,00 ml	10,0 %
bidest. Wasser	ad 500,00 ml	pH 6.8

Durchführung:

Die Proteinproben (10-30 µl) wurden mit demselben Volumen zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und zur Solubili-

sierung 5 min bei 100°C auf dem Heizblock erhitzt. Danach konnten sie mehrere Wochen lang bei -20°C aufbewahrt werden.

3.2.7.2.3 Durchführung der Elektrophorese

In die mit Elektrodenpuffer gefüllten Taschen des Sammelgels wurden je nach Proteingehalt 15-60 µl der Probe vorsichtig unterschichtet. Bei einer Stromstärke von 20 mA betrug die Elektrophoresedauer etwa 3 h.

3.2.7.3 Bestimmung der relativen Molekülmassen von Proteinen

Bei der Solubilisierung binden die meisten Proteine eine konstante Menge SDS, das sich an die hydrophoben Regionen der Aminosäurekette anlagert. Es entsteht ein Komplex mit negativen Ladungen; die Eigenladungen des Proteins sind vernachlässigbar. In einem Polyacrylamidgel mit Molekularsiebeffekt werden die Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt, wobei die Laufstrecke jedes Moleküls dem Logarithmus seiner Molekülmasse proportional ist (106).

3.2.7.4 Nachweis der Proteine durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Lösungen:

Färbelösung:

2,5	g	Serva Blue G
450	ml	Methanol
450	ml	bidest. Wasser
100	ml	Eisessig

Entfärbelösung:

200	ml	Methanol
70	ml	Eisessig
730	ml	bidest. Wasser

Durchführung:
Um die aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurde das Gel bei Raumtemperatur etwa 30 min unter leichtem Schütteln fixiert und gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen des Gels mit Entfärbelösung entfernt.

3.2.7.5 Nachweis radioaktiv markierter Proteine durch Fluorographie (107)

Aufgrund der geringen Energie der ß-Strahlung können ^{3}H-markierte Proteine nicht durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Durch Einbau eines Szintillators in das Polyacrylamidgel wird die Elektronenenergie in Lichtenergie umgewandelt, und die entstehenden Photonen sind in der Lage, den Röntgenfilm zu belichten. Bei Isotopen mit einer höheren ß-Strahlungsenergie läßt sich durch diese Methode die Expositionszeit deutlich verkürzen.

Durchführung:
Nach der elektrophoretischen Auftrennung der ^{3}H-Leucin-markierten Lipopeptid-Bindeproteine wurden die Gele wie in 3.2.7.4 beschrieben fixiert, gefärbt, entfärbt und 30 min unter gelegentlichem Schütteln mit Enlightening behandelt (108). Danach wurden sie im Vakuum getrocknet (2 h bei 80°C) und dabei auf Whatman-Papier 3 MM aufgezogen. Die Position der Molekularmassenstandards wurde mit ^{3}H-Leucin-markierter Tinte eingezeichnet (109).
Die in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden wie in 3.2.7.1.3 beschrieben fixiert und danach 45-60 min mit EN^{3}HANCE inkubiert. Die EN^{3}HANCE-Lösung wurde verworfen und das Gel nach zehnminütigem Waschen mit Wasser wie beschrieben getrocknet.

3.2.7.6 Sensibilisierung der Röntgenfilme (110)

Röntgenfilme können kurz vor der Exposition durch einen Lichtblitz sensibilisiert werden, so daß sich die notwendige Expositionszeit um das 16-fache verkürzt. Benutzt wurden Röntgenfilme der Firma Kodak (X-Omat AR5). Sensibilisiert wurde der Film mit einem Blitzlichtgerät, dessen Front mit rotem Filterpapier bedeckt war, im Abstand von 50 cm für 5/1000 sec.

3.2.7.7 Autoradiographie der markierten Proteine

In einer Röntgenfilmkassette (bei ^{32}P-markierten Proteinen mit Verstärkerfolie) wurde der Film mit der belichteten Seite auf das getrocknete Gel gelegt und unterschiedlich lange bei -70°C exponiert. Die Röntgenfilme wurden nach Vorschrift der Firma Kodak entwickelt und fixiert.

3.2.8 Wirkung synthetischer Lipopeptide auf den Phosphoinositstoffwechsel

3.2.8.1 Markierung ruhender Milzzellen mit myo-(2-^{3}H)Inosit

Lösungen:

Inositfreies Medium:		Endkonzentration
BMED-Pulvermedium	9,34 g/l	pH 7.2
Tris-Base	2,42 g/l	20 mM
Natriumhydrogencarbonat	2,02 g/l	24 mM
FCS (dialysiert)	52,0 ml/l	5 %
L-Glutamin (200 mM)	10,0 ml/l	2 mM
2-Mercaptoethanolstammlsg.	0,5 ml/l	50 µM
Penicillin-Streptomycin	10,0 ml/l	

Gey-Lysispuffer:

Stammlösung A:

NH_4Cl	35,0 g
KCl	1,85 g
$Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$	1,5 g
KH_2PO_4	0,12 g
Glucose	5,0 g
Phenolrot	50,0 mg
bidest. Wasser	ad 1000,0 ml

Lösung autoklavieren

Stammlösung B:

$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	0,42 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,14 g
$CaCl_2$	0,34 g
bidest. Wasser	ad 100,0 ml

Lösung autoklavieren

Stammlösung C:

$NaHCO_3$	2,25 g
bidest. Wasser	ad 100,0 ml

Lösung autoklavieren

vor Gebrauch 20 Teile Lösung A, 5 Teile Lösung B, 5 Teile Lösung C und 70 Teile bidest. Wasser (steril) mischen

Durchführung:

Die Milzzellen (Balb/c) wurden wie in 3.2.5.2 beschrieben isoliert. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde das Pellet in 10 ml Gey-Lysispuffer suspendiert und 4 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 4 ml 100%igem FCS unterschichtet und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Die ruhenden Lymphozyten wurden über einen Percoll-Dichtegradienten angereichert (siehe 3.2.5.2). Die Zellen wurden zweimal mit BMED-Medium gewaschen, in inositfreien Medium aufgenommen und nach Zugabe von 17 µCi (629 kBq) myo-(2-^{3}H)Inosit (spezifische Aktivität 17 Ci/mmol = 629 GBq/mmol) pro 1 ml-Kultur bei einer Zelldichte von 6 bis 7 x 10^6/ml in Polypropylenröhrchen 21 h markiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zur Bestimmung der Markierungsausbeute wurde von einem Aliquot die Radioaktivität gemessen.

3.2.8.2 Extraktion der markierten Inositverbindungen

Lösungen:

Mitogen	Stammlösung	Volumen im Test
TPP in 150 mM NaCl	0,50 mg/ml	0,030 ml
LPS in 150 mM NaCl	0,50 mg/ml	0,050 ml
Con A in 150 mM NaCl	0,05 mg/ml	0,050 ml
Kaninchen-anti-Maus IgM	1,40 mg/ml	0,018 ml

Durchführung:
Die myo-(2-^{3}H)Inosit-markierten Zellen wurden in MEM suspendiert und auf eine Zelldichte von 6 x 10^{6}/ml eingestellt. Je 0,45 ml der Zellsuspension wurden 30 min im Brutschrank vorinkubiert. Nach Zugabe der verschiedenen Mitogene (Gesamtvolumen 0,05 ml) wurde die Kultur in Gegenwart von 5 mM LiCl (10 µl 500 mM LiCl) 1 h bei 37°C aktiviert. Die inosithaltigen Verbindungen wurden mit Chloroform/Methanol/Wasser (1:1:0,93) extrahiert: Die Aktivierung der Zellen wurde durch Zusatz von 0,7 ml Chloroform und 1,4 ml Methanol beendet. Die Lösung wurde mit 0,7 ml 2,4 N HCl und 0,7 ml Chloroform versetzt, intensiv geschüttelt und zur Phasentrennung 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (200 x g). Die wäßrige Phase wurde abgehoben und mit 1,4 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden gemischt und mit 2,8 ml Methanol/1 N HCl (1:1) gewaschen. Zuletzt wurden alle wäßrigen und alle organischen Phasen vereinigt.

3.2.8.3 Analyse der inosithaltigen Phospholipide

Lösungen:
Laufmittel für die 1. Dimension:
Chloroform/Methanol/25% Ammonik/Wasser (90:74:13:8)
Laufmittel für die 2. Dimension:
Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (98:13:50:10)

Durchführung:
Die organische Phase wurde in einer Speed-Vac-Zentrifuge einrotiert und der lipidhaltige Rückstand in 30-50 µl Chloro-

form/Methanol (2:1) aufgenommen. Von einem Aliquot wurde die in die Lipide eingebaute Radioaktivität bestimmt. Anschließend wurden die verschiedenen Verbindungen dünnschichtchromatographisch analysiert. Die Probe wurde auf eine DC-Fertigplatte (Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm, 20 cm x 20 cm) aufgetragen und in der ersten Dimension mit einem alkalischen Laufmittel 90 min aufgetrennt. Danach wurde die DC-Platte 15 min bei Raumtemperatur und weitere 15 min bei 70°C getrocknet, bevor die Lipide in der zweiten Dimension mit einem saueren Laufmittel aufgetrennt wurden (Laufzeit 90 min). Die einzelnen Lipidflecken wurden mit Joddampf angefärbt. Um die markierten inosithaltigen Lipide nachzuweisen, wurden die DC-Platten mit EN^{3}HANCE besprüht und zusammen mit einem sensibilisierten Kodak X-Omat AR5-Film 2 bis 3 Wochen bei -70°C exponiert. Anhand der Fluorographie wurden die einzelnen Flecken lokalisiert. Zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität wurde die Kieselgelschicht von der Platte abgetragen und in Szintillationsflüssigkeit aufgenommen.

3.2.8.4 Trennung der wasserlöslichen Inositphosphate

Lösungen:

Puffer I:

0,005 M Dinatriumtetraborat/0,06 M Natriumformiat

Puffer II:

0,1 M Ameisensäure/0,2 M Ammoniumformiat

Puffer III:

0,1 M Ameisensäure/0,4 M Ammoniumformiat

Puffer IV:

0,1 M Ameisensäure/1 M Ammoniumformiat

Durchführung:

Die wäßrige Phase (5,4 ml) wurde mit 9 mM $Na_2B_4O_7$/2 N KOH auf pH 8-9 eingestellt und bei Raumtemperatur 10 min zentrifugiert. Von einem Aliquot wurde die Radioaktivität der wasserlöslichen Inositverbindungen bestimmt, der Rest wurde auf eine Anionenaustauschersäule (Dowex-1x8-400, 200-400 mesh, Formiatform; 1

ml Harz) aufgetragen (111). Inosit wurde mit 2 x 1,5 ml und 2 x 3,5 ml bidest. Wasser von der Säule gewaschen, PtdIns mit Puffer I (2 x 1,5 ml, 2 x 3,5 ml). Die Inositphosphate - IP, IP_2, IP_3 - wurden nacheinander mit Puffer II, III und IV eluiert. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden je 1,5 ml des Eluats mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

3.2.9 Affinitätschromatographische Anreicherung von Bindeproteinen für synthetische Lipopeptide

3.2.9.1 Synthese der Affinitätssäule

Liganden mit freien Carboxylgruppen können an unlösliche Trägermaterialien gekoppelt werden, die als funktionelle Gruppen primäre Aminogruppen enthalten. Als Kondensationsreagens eignen sich vor allem N,N'-disubstituierte Carbodiimide. Um dabei die Bildung von N-Acylharnstoff-Derivaten auszuschalten und das Racemisierungsrisiko gering zu halten, werden zusätzlich sogenannte Additive verwendet (112). Aus der Carboxylkomponente und dem Carbodiimid entsteht zunächst ein sehr reaktionsfähiges O-Acyl-isoharnstoff-Derivat, das sich mit 1,2-Dinucleophilen wie N-Hydroxybenzotriazol unter Bildung eines Aktivesters umsetzt (113). Im Gegensatz zum stark racemisierungslabilen O-Acylharnstoff-Derivat verläuft die Aminolyse des intermediär gebildeten Aktivesters unter Ausbildung einer Peptidbindung praktisch racemisierungsfrei.

3.2.9.1.1 Kopplung von Tripalmitoylpentapeptid an derivatisierte Glaspartikel

Als Trägersubstanz für die Affinitätschromatographie wurden Glasperlen mit kontrollierter Porosität verwendet (114), die Propylseitenketten mit endständigen Aminogruppen als funktionelle Gruppe tragen (Aminopropyl-CPG, Gruppenkapazität 0,18

mmol/g, 200-400 mesh). Zur Voraktivierung wurden 94 mg TPP (74 µmol) in 3 ml warmem $CHCl_3$ gelöst, mit 13 mg (88,4 umol) 1-Hydroxy-benzotriazol und 74 µl einer frisch zubereiteten N,N'-Dicyclohexylcarbodiimidlösung (1 mol/l, in Dichlormethan) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zusatz von 400 mg Aminopropyl-CPG (72 µmol NH_2-Gruppen) wurde die Suspension weitere 54 h geschüttelt. Danach wurde das Gelmaterial mit Chloroform (3 x 5 ml), Chloroform/Methanol 1:1 (3 x 5 ml) und Methanol (3 x 5 ml) gewaschen und im Exsikkator über Kieselgel getrocknet.

3.2.9.1.2 Bindungskontrolle durch Aminosäureanalyse

2,5 mg des Gelmaterials wurden in 2 ml 6 N HCl bei 110°C 18 h in Glasampullen erhitzt. Das Hydrolysat wurde vorsichtig im Rotationsverdampfer eingeengt. Um Säurespuren zu entfernen, wurden 5 ml bidest. Wasser hinzugefügt und anschließend abrotiert. Der Rückstand wurde in 5 ml Natriumcitratpuffer, pH 2.2, aufgenommen. Zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren wurden 50-200 ul der Probe in einem Biotronik Analysator LC 6000 E analysiert und mit einem Aminosäurestandard verglichen.

3.2.9.1.3 Inaktivierung der freien Aminogruppen am Trägermaterial

Die nach der Kopplung von TPP an Aminopropyl-CPG verbliebenen Aminogruppen des Trägermaterials mußten blockiert werden, damit sie nicht als Ionenaustauscher wirken und eine spezifische Proteinadsorption vortäuschen können. Als Derivatisierungsreagens diente Acetanhydrid (115).

Durchführung:
Das Lipopeptid-Affinitätsharz wurde in 2 ml Chloroform suspendiert und nach Zusatz von 4 ml Acetanhydrid 1 h bei 65°C geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Harz mit

N,N'-Dimethylformamid (3 x 5 ml), bidest. Wasser (3 x 5 ml) und Methanol (3 x 5 ml) gewaschen und über Kieselgel getrocknet. In einem Parallelansatz wurden 200 mg Aminopropyl-CPG unter denselben Reaktionsbedingungen acetyliert.

3.2.9.1.4 Überprüfung der Acetylierung durch Bestimmung der primären Aminogruppen

Die Bestimmung der am Affinitätsharz verbliebenen unblockierten Aminogruppen erfolgte durch einen Farbtest nach (116).

Lösungen:
Kaiser's Reagens:
Lösung A: 500 mg Ninhydrin in 10 ml Ethanol
Lösung B: 80 g Phenol in 20 ml Ethanol
Lösung C: 2 ml 0,001 M KCN-Lösung, ad 100 ml mit Pyridin

Durchführung:
Etwa 5 mg Gelmaterial wurden in einem verschließbaren Reaktionsgefäß nach Zusatz von 3 Tropfen Kaiser's Reagens 5 min bei 100°C erhitzt. Eine positive Ninhyrinreaktion wurde durch eine Blaufärbung des Gelmaterials und der Lösung angezeigt. Eine sehr schwache Blaufärbung der Glaspartikel entsprach praktisch einer negativen Ninhydrinreaktion und bedeutete, daß mehr als 99% der Aminogruppen acetyliert worden waren.

3.2.9.1.5 Modifizierung des Liganden während der Acetylierungsreaktion

Um zu überprüfen, ob durch die Acetylierung der Aminogruppen am Trägermaterial eine chemische Modifizierung des Liganden erfolgt, wurden in einem Parallelansatz je 5 mg TPP in wenig warmem Chloroform gelöst, mit 0,1 ml Acetanhydrid versetzt und 1 h bzw. 4 h bei 60°C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Produkt zur Entfernung von Säurespuren mit Wasser und anschließend mit Methanol und Diethylether gewaschen. Die Reak-

tionsprodukte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, wobei als Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser verwendet wurde (65:25:4). Die einzelnen Substanzflecken wurden mit Chlor/4,4'-Bis(dimethylamino)diphenylmethan sichtbar gemacht (117).

Für die Arbeiten standen zwei Affinitätsharze zur Verfügung:

a) derivatisiert mit Tripalmitoylpentapeptid (CPG-TPP)
b) derivatisiert mit Acetanhydrid (CPG-NHAc)

3.2.9.2 Bindeproteine im Mausserum für synthetische Lipopeptide

3.2.9.2.1 Blutentnahme und Serumgewinnung bei der Maus (118)

Einer lebenden Maus kann unter Narkose aus dem Plexus retroorbitalis Blut entnommen werden, ohne das Auge zu schädigen. Dabei ist es möglich, bis zu 1 ml Blut zu gewinnen, woraus man etwa 0,3 ml Serum erhält.

Durchführung:
Eine mit Diethylether betäubte Maus wurde mit Daumen und Zeigefinger so im Nacken gegriffen, daß die Augäpfel leicht hervortraten. Mit einer Pasteurpipette wurde im äußeren Augenwinkel etwa 4-6 mm tief hinter dem Auge eingestochen, bis das Blut in die Pipette floß. Das Blut wurde in Eppendorfgefäße umgefüllt und 1 h bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Gerinnung stehen gelassen. Das Blutgerinsel wurde abzentrifugiert (10 min, 13 000 x g, Eppendorfzentrifuge) und das Serum bei 4°C aufbewahrt.

3.2.9.2.2 Affinitätschromatographische Trennung von Serumproteinen

Lösungen:

Puffer I:

0,15 M NaCl
0,01 M Tris-HCl, pH 7.4
0,001 M PMSF
0,01 % Natriumazid

Puffer II:

Puffer I mit 4% SDS

Durchführung:

400 mg Lipopeptid-Affinitätsharz (siehe 3.2.9.1.3) wurden bei Raumtemperatur in einer Säule (3 cm x 0,8 cm) mit 15 ml Puffer I äquilibriert (Geschwindigkeit 2 ml/h). 60 bis 70 µl Mausserum wurden auf die Säule aufgetragen und nach dem Eindringen in das Gelmaterial 30 min inkubiert. Danach wurde solange mit Puffer I gewaschen (Fraktionsvolumen 0,5 ml), bis in den Fraktionen bei λ = 280 nm keine erhöhte Absorption im Vergleich zum Pufferleerwert auftrat. Die adsorbierten Proteine wurden mit Puffer II eluiert. In allen Fraktionen wurde der Proteingehalt photometrisch bestimmt und danach ein Elutionsprofil aufgestellt.

3.2.9.2.3 Bestimmung der unspezifischen Adsorption

Nach den in 3.2.9.2.2 beschriebenen Bedingungen wurde Mausserum auf eine CPG-NHAc-Säule aufgetragen. Die nicht gebundenen Proteine wurden mit Puffer I, die an den derivatisierten Glaspartikeln adsorbierten Proteine mit Puffer II eluiert. Die so erhaltenen Proteinfraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert.

3.2.9.2.4 Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Lösungen:

siehe 3.2.7.1

Durchführung:

Je 50 µl der zu untersuchenden Fraktionen wurden mit demgleichen Volumen zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und zur Solubilisierung der Proteine 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden entweder bei -20°C aufbewahrt oder sofort gelelektrophoretisch untersucht (siehe 3.2.7.1.3). Das SDS-Polyacrylamidgel (180 mm x 170 mm x 1,5 mm) bestand aus einem 11%igen Trenn- und einem 5,5%igen Sammelgel. Bei einer Stromstärke von 30 mA betrug die Elektrophoresedauer etwa 4 h. Die so aufgetrennten Proteine wurden fixiert und mit Coomassie Blau angefärbt (siehe 3.2.7.4).

Tab. 5: Zusammensetzung des Gels

	Trenngel 11%	Sammelgel 5,5%
AA-Stammlösung	14,67 ml	1,5 ml
Trenngelpuffer	10,67 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,4 ml
bidest. Wasser	14,59 ml	6,1 ml
	Lösung entgasen	
TEMED	25 µl	9 µl
APS 10%	55 µl	25 µl

3.2.9.3 Lymphozytenbindeproteine für synthetische Lipopeptide

Lösungen:

Puffer I:

0,15 M NaCl
0,01 M Tris-HCl, pH 7.4
0,001 M PMSF
0,10 % Triton X-100
0,02 % Natriumazid

Puffer II:

Puffer I mit 0,3 mg/ml TPP

Puffer III:

Puffer I mit 4% SDS

Durchführung:

200 mg CPG-TPP wurden in einer Säule (3 cm x 0,8 cm) bei Raumtemperatur mit 20 ml Puffer I (Geschwindigkeit 1 ml/h) äquilibriert. Etwa 1,2 x 10^7 cpm des ^{3}H-Leucin-markierten Milzzelllysats aus 3.2.6.1 wurden auf das Affinitätsharz aufgetragen und nach dem Eindringen in das Gelmaterial 30 min inkubiert. Danach wurde solange mit Puffer I gewaschen, bis sich in den Fraktionen die Radioaktivität nicht mehr änderte (Fraktionsgröße 0,33 ml). Die am Affinitätsharz adsorbierten Proteine wurden selektiv mit Puffer II, alle übrigen Proteine mit Puffer III eluiert. Anhand der in den Fraktionen ermittelten Radioaktivität wurde ein Elutionsprofil aufgestellt. Die Lipopeptid-Bindeproteine wurden durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.7.1 und 3.2.7.2).

4. ERGEBNISSE

4.1 Stimulationsexperimente

4.1.1 Mitogenität des für die Kopplung verwendeten TPP

Kultiviert man Milzzellen einer Maus in Gegenwart von Lipoprotein oder TPP, einem dem N-Terminus von Lipoprotein analogen synthetischen Lipopeptid, teilen sich je nach Mausstamm bis zu 30% der B-Zellen und differenzieren nach einigen Tagen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Zum Nachweis der mitogeninduzierten Proliferation der B-Lymphozyten wurde der Einbau von (^{3}H)Thymidin in die DNA der Zellen bestimmt.
Das für die affinitätschromatographische Anreicherung der Mitogen-Bindeproteine verwendete TPP wurde vor der Kopplung an Glaspartikel auf Mitogenität untersucht und mit der biologischen Aktivität von nativem Lipoprotein verglichen.

Das synthetische Lipopeptid TPP induzierte in Milzzellkulturen von Balb/c-Mäusen eine Proliferation der Zellen, was durch einen im Vergleich zur Kontrolle erhöhten ^{3}H-Thymidineinbau festgestellt wurde. TPP zeigte einen mitogenen Effekt oberhalb von 0,1 µg/ml (10^{-7} M) und erreichte das Aktivitätsoptimum zwischen 5 und 12 µg/ml (4-9 x 10^{-6} M) (Abb. 2A). Lipoprotein induzierte oberhalb von 1 µg/ml (10^{-7} M) einen verstärkten Einbau von (^{3}H)Thymidin; eine optimale Proliferation der Lymphozyten erfolgte zwischen 20 und 40 µg/ml (3-6 x 10^{-6} M) (Abb. 2B). Das hier verwendete synthetische Lipopeptid besaß somit eine dem nativen Lipoprotein vergleichbare Mitogenität.

Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Zusammensetzung des Kultivierungsmedium auf die Mitogenität des Lipopeptids hat. In einem Parallelansatz wurden Milzzellen von Balb/c-Mäusen in RPMI 1640-Medium mit 3,3% FCS (Seromed), mit 5% FCS (Flow) und in einem modifizierten Iscove's Medium ohne Serumzusatz in Gegenwart von TPP kultiviert. Die Auswertung des ^{3}H-Thymidineinbaus zeigte, daß in serumfreiem Iscove's Medium das Optimum der mitogenen Aktivität zwischen 5 und 12 µg/ml (4

bis 9 x 10^{-6} M) TPP lag, in den serumhaltigen Kulturen dagegen zwischen 12 und 50 µg/ml (1 bis 4 x 10^{-5} M).

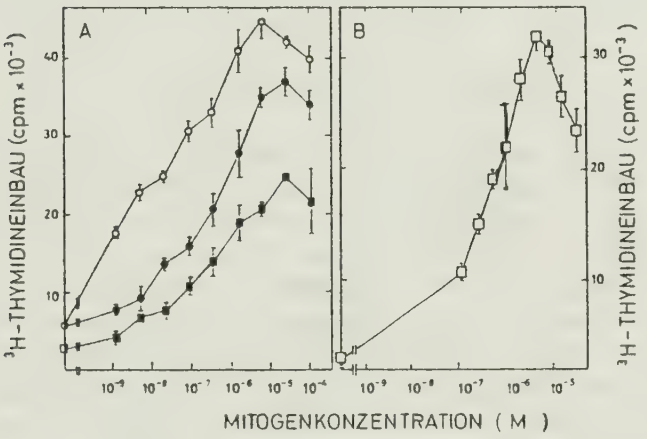

Abb. 2: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von (^{3}H)Thymidin in die DNA von Milzzellen einer Balb/c-Maus in Gegenwart von TPP (A) oder Lipoprotein (B). Die Experimente wurden nach 3.2.2.3 durchgeführt. Die Zellen wurden in serumfreiem Iscove's Medium (o , □), in RPMI 1640 mit 3,3% FCS (■) und mit 5% FCS (●) kultiviert. Mittelwert und Standardabweichung aus einem Dreifachansatz.

Die Höhe des Stimulationsmaximums und damit die Fähigkeit, Milzzellen polyklonal zu aktivieren, unterschied sich bei den serumhaltigen und serumfreien Kulturen. Während in Medium mit 3,3% FCS (Seromed) das Maximum der Stimulation bei 25000 cpm lag (Kontrolle: 3800), erhöhte es sich in Kulturmedium mit 5% FCS (Flow) auf 37000 cpm (Kontrolle: 5600). Aufgrund der unterschiedlichen Werte in den Kontrollkulturen wurden die Stimulationsindices (SI) ermittelt, die sich aus dem Quotienten cpm Probe/cpm Kontrolle berechnen lassen. Der Stimulationsindex war in beiden Versuchsreihen mit SI = 6,6 identisch. In den

serumfreien Milzzellkulturen war das Stimulationsmaximum mit 45000 cpm (Kontrolle: 5600 cpm) 1,8-fach höher als bei Zusatz von 3,3% FCS bzw. 1,2-fach höher als bei Zusatz von 5% FCS; der Stimulationsindex erhöhte sich auf SI = 8. Es ist also möglich, Stimulationsexperimente mit synthetischen Lipopeptiden in serumfreien Medien ohne das chemisch ungenügend charakterisierte und außerdem kostspielige FCS durchzuführen.

4.1.2 Mitogenität von acetyliertem TPP

Nach der Kopplung von TPP an porenkontrollierte Glaspartikel, die Aminopropylseitenketten als reaktive Gruppen enthalten, mußten die verbliebenen Aminogruppen blockiert werden, damit sie nicht als Ionenaustauscher wirken und eine spezifische Proteinbindung an das Affinitätsharz vortäuschen können. Als Acetylierungsreagens diente Acetanhydrid, das allerdings nicht nur mit Amino-, sondern auch mit Hydroxylgruppen reagieren kann. Die Acetylierungsbedingungen wurden so gewählt, daß die Hydroxylgruppe des Serins im Tripalmitoylpentapeptidmolekül nachweislich nicht derivatisiert wurde (siehe 4.7.4). Eine geringe chemische Modifikation, die auch zu einem veränderten Bindungsverhalten zwischen dem am Affinitätsharz immobilisierten Lipopeptid und möglichen Bindeproteinen führen könnte, ließ sich allerdings nicht völlig ausschließen. Dies konnte jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachgewiesen werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine teilweise bzw. vollständige Acetylierung der Serinseitenkette zu einer Veränderung der mitogenen Aktivität führt.

In Abb. 3 sind die Dosis-Wirkungskurven aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten für TPP und dessen acetyliertem Derivat dargestellt. TPP erreichte sein Aktivitätsoptimum bei etwa 25 µg/ml (2×10^{-5} M), wobei diese Mitogenkonzentration etwas höher lag als in dem bereits beschriebenen Experiment (siehe Abb. 2A). Der Stimulationsindex betrug SI = 13 und war damit 1,6-fach höher als oben erwähnt. Diese Unterschiede sind auf nicht identische Tripalmitoylpentapeptidpräparationen zu-

rückzuführen. Für acetyliertes TPP lag das Stimulationsoptimum bei einer vergleichbaren Konzentration (7-13 ug/ml, entsprechend 0,5-1 x 10^{-5} M). Der Stimulationsindex betrug SI = 11,5 und unterschied sich damit nicht signifikant vom SI-Wert des unmodifizierten Lipopeptids. Die Mitogenität von TPP wurde somit durch die Acetylierung der Seringruppe(n) nicht verändert.

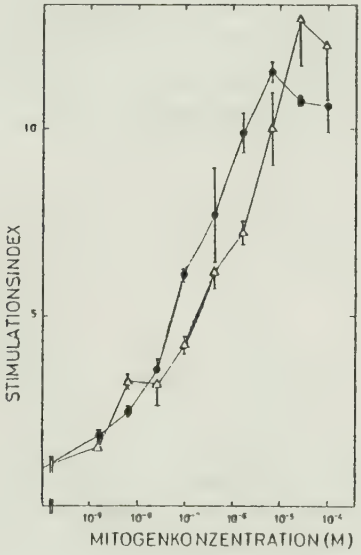

Abb. 3: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von (^{3}H)Thymidin in die DNA von Milzzellen einer Balb/c-Maus in Gegenwart von acetyliertem (●) und unverestertem (Δ) TPP. Die Experimente wurden wie in 3.2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden in serumfreiem modifiziertem Iscove's Medium kultiviert. Mittelwert und Standardabweichung aus einem Dreifachansatz.
Kontrolle: 7138 ± 817 (Δ), 4253 ± 551 (●)
Maximum: 91996 ± 9397 (Δ), 48774 ± 1067 (●)

4.1.3 Mitogenität von Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4(FITC)_{2-4}$-OH

Für die Bindungsstudien mit synthetischen Lipopeptiden war es notwendig, ein Derivat zu synthetisieren, das relativ gut wasserlöslich ist und außerdem eine reaktive Gruppe enthält, die mit Fluoresceinverbindungen kovalent reagiert. Pam_3Cys-Ser-(Lys)4-OH wurde mit äquimolaren Mengen Fluoresceinisothiocyanat in das Lipopeptid Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4(FITC)_{2-4}$-OH überführt, das im Gegensatz zu TPP nach Beschallen in 0,001% Triton X-100 gut wasserlöslich ist. In einem Stimulationstest sollte untersucht werden, ob das FITC-Derivat eine dem nicht-derivatisierten Lipopeptid vergleichbare Mitogenität besitzt und ob dessen mitogene Aktivität der des TPP entspricht.

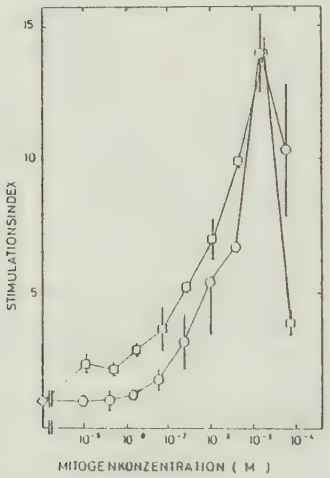

Abb. 4: Dosis-Wirkungskurve für den Einbau von (^{3}H)Thymidin in die DNA von Milzzellen einer Balb/c-Maus in Gegenwart von Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4$-OH (□) und Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4(FITC)_{2-4}$-OH (●). Die Experimente wurden nach 3.2.2.3 durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung aus einem Dreifachansatz.

Kontrolle: 3677 ± 379 (□), 6287 ± 713 (●)

Maximum: 51416 ± 835 (□), 88262 ± 8487 (●)

In Abb. 4 sind die Dosis-Wirkungskurven für das Lipopeptid Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4$-OH und dessen FITC-markiertem Derivat dargestellt. Beide Verbindungen besaßen ein identisches Stimulationsoptimum bei etwa 2 x 10^{-5} M (30 µg/ml) und einen maximalen Stimulationsindex von SI = 14. Die Derivatisierung mit Fluoresceinisothiocyanat hatte also keinen Einfluß auf die biologische Aktivität. Im Gegensatz zu TPP (siehe Abb. 2A) besaßen beide Lipopeptide in höheren Konzentrationen eine zellschädigende Wirkung, wie der deutlich verminderte ^{3}H-Thymidineinbau zeigte.

4.2 Bindungsstudien mit FITC-markiertem Lipopeptid

4.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

4.2.1.1 Bindung des FITC-Lipopeptids an Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden von dem serumhaltigen Kulturmedium abzentrifugiert und mehrmals gewaschen, um eine unspezifische Bindung des FITC-Lipopeptids an die Zelloberfläche infolge einer Adsorption durch zellgebundene Serumproteine zu reduzieren. Abschließend wurden die Zellen mit 11 bis 95 µg/ml (5 bis 50 x 10^{-6} M) Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4(FITC)_{2-4}$-OH versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Lipopeptid wurde anschließend durch Waschen entfernt. Die markierten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei wurden die Intensität und die Verteilung der Fluoreszenz auf der Zelloberfläche untersucht.

Es stellte sich heraus, daß die Tumorzellen bei einer Lipopeptidkonzentration von 22 µg/ml (1 x 10^{-5} M) gerade noch sichtbar gefärbt wurden. Mit zunehmender Konzentration des FITC-Derivats nahm die Intensität der Fluoreszenz zu und erreichte ab 66 µg/ml (3 x 10^{-5} M) ein Maximum, soweit dies visuell erkennbar war. Allerdings besaß das FITC-Lipopeptid bei dieser hohen Kon-

zentration eine zellschädigende Wirkung, was sich sowohl im Stimulationstest (siehe 4.1.3) als auch lichtmikroskopisch an einem vermehrten Auftreten toter Zellen zeigte. Daher wurde für die weiteren mikroskopischen Untersuchungen eine Lipopeptidkonzentration von 40 bis 50 µg/ml (1,8-2,6 x 10^{-5} M) verwendet. Weiterhin zeigte sich, daß die Bindung des FITC-Lipopeptids an die Zelloberfläche in Gegenwart von Albumin im Medium verhindert wurde.

Es sollte untersucht werden, ob synthetische Lipopeptide aufgrund ihrer Hydrophobizität unspezifisch an verschiedene Zelltypen binden oder selektiv über spezifische Bindungsstellen an die reaktiven Zellen. Dazu wurden verschiedene Tumorzellinien mit dem FITC-Lipopeptid markiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Tab. 6: Bindung von Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4(FITC)_{2-4}$-OH an Tumorzellen

Zellinie	Ursprung	Färbung
BCl_1	B-Lymphom	++
EL-4	T-Thymom	++
J774	Makrophagenlinie	++
$P388D_1$ (adhärent)	Makrophagenlinie	++
P815	Mastocytom	++

In Tab. 6 ist die Bindung von Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4(FITC)_{2-4}$-OH an verschiedene Tumorzellinien zusammengefaßt. Daraus ist ersichtlich, daß dieses Lipopeptid sowohl án B-Lymphozyten und Makrophagen als auch an T-Lymphozyten und Mastzellen bindet, unabhängig von seiner Funktion als polyklonaler B-Zell-Aktivator. Zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Bindung konnte allerdings nicht unterschieden werden. Eine Quantifizie-

rung der Bindung war im Fluoreszenzmikroskop ebenfalls nicht möglich.

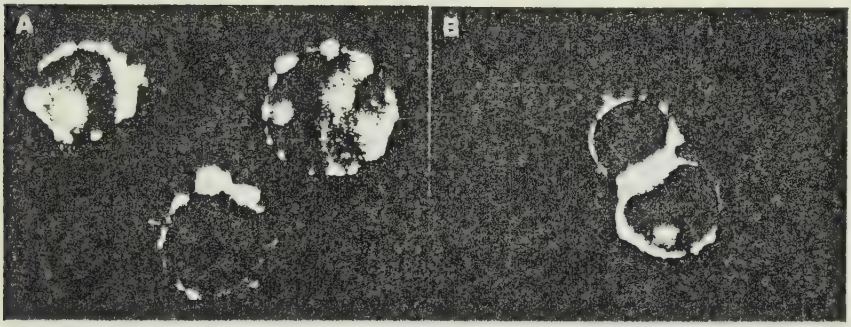

Abb. 5: Bindung von $Pam_3Cys-Ser-(Lys)_4(FITC)_{2-4}-OH$ an verschiedene Tumorzellinien. Je 1,5 x 10^6 Zellen wurden mit 0,052 mg/ml FITC-Lipopeptid 30 min bei 4^oC in Gegenwart von Natriumazid inkubiert.

A BCl_1

B P815

Durch Vorinkubation mit einem zehnfachen Überschuß des Lipopeptids TPP (2 x 10^{-4} M) sollte untersucht werden, ob die Bindung des FITC-markierten Derivats an die Zelloberfläche inhibiert werden kann. Die Zellen (BCl_1) wurden deshalb 1 h bei 4^oC mit TPP inkubiert und nach dem Waschen mit dem FITC-Lipopeptid markiert. Unter diesen experimentellen Bedingungen war die Bindung des markierten Lipopeptids an die Zellen nicht hemmbar, und eine partielle Inhibition der Lipopeptidbindung durch Blockierung von möglichen spezifischen Bindungsstellen konnte nicht beobachtet werden.

4.2.1.2 Bindung des FITC-Lipopeptids an Leukozyten

Um die Bindung des FITC-Lipopeptids an Milzlymphozyten, Thymozyten und Knochenmarksmakrophagen zu untersuchen, wurden die

Zellen mit 40 µg/ml $Pam_3Cys\text{-}Ser\text{-}(Lys)_4(FITC)_{2-4}\text{-}OH$ inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Tab. 7: Bindung von $Pam_3Cys\text{-}Ser\text{-}(Lys)_4(FITC)_{2-4}\text{-}OH$ an Leukozyten

Zelltyp	Stamm	Färbung
Milzlymphozyten	Balb/c (Maus)	++
Thymozyten	C57Bl/10 (Maus)	++
Thymozyten	Sprague-Dawley (Ratte)	++
Knochenmarks-makrophagen	C3H/HeJ (Maus)	++

In Tab. 7 ist die Bindung von FITC-markiertem $Pam_3Cys\text{-}Ser\text{-}(Lys)_4\text{-}OH$ an verschiedene Immunzellen zusammengefaßt. Daraus ist ersichtlich, daß dieses Lipopeptid nicht nur an B-Lymphozyten und Makrophagen bindet, sondern auch an Thymozyten, obwohl letztere durch Lipoprotein und synthetische Analoga nicht aktiviert werden. Weiterhin konnte kein Unterschied zwischen der Bindung des Lipopeptids an Tumorzellen und an die entsprechenden Primärzellen beobachtet werden.

4.2.1.3 Lokalisation des gebundenen FITC-Lipopeptids

Um die Verteilung der Fluoreszenz auf der Zelloberfläche zu untersuchen, wurden die verschiedenen Tumorzellinien sowie Milzlymphozyten und Thymozyten mit dem FITC-Lipopeptid bei $4^{\circ}C$ markiert und anschließend im Brutschrank bzw. bei Raumtemperatur kultiviert. In einstündigen Abständen wurde die Färbung der Zellen analysiert.

Die Tumorlinien BCl_1, EL-4, $P388D_1$ (adhärenter Subklon) und J774 wurden durch das FITC-Lipopeptid angefärbt, wobei zunächst eine diffuse, gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz auf der Zelloberfläche zu erkennen war. Innerhalb von 30 min bildeten sich kleine, unregelmäßig über die gesamte Oberfläche verteilte Aggregate ("patching"). Nach 60-90 min sammelte sich die zellgebundene Fluoreszenz in einer kappenförmigen Struktur, die etwa ein Drittel der Zelloberfläche bedeckte ("capping"). Diese gerichtete Bewegung erfolgte nur in stoffwechselaktiven Zellen und wurde in Gegenwart von Natriumazid gehemmt. Eine genauere Betrachtung zeigte, daß sich die Zellen während der Ausbildung der Kappe geringfügig länglich verformten. Bei den Zellen, die bei Raumtemperatur gehalten wurden, war nach etwa 2 h die Fluoreszenz von der Zelloberfläche verschwunden. Durch Trypanblau-Ausschlußfärbung wurde gezeigt, daß es sich dabei um vitale Zellen handelte. Im Kulturüberstand konnten zahlreiche fluoreszierende Membranteile nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet auf eine Abschilferung ("shedding") des gebundenen Lipopeptids hin. Fluoreszierende Vakuolen konnten bei den untersuchten Tumorzellen nicht beobachtet werden. Eine Internalisierung des membrangebundenen Lipopeptids konnte aber nicht völlig ausgeschlossen werden.

Milzlymphozyten, Thymozyten und Knochenmarksmakrophagen ließen sich ebenso wie die entsprechenden Tumorzellen mit dem FITC-Lipopeptid Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4(FITC)_{2-4}$-OH färben. Eine Untersuchung der zeitlichen Fluoreszenzverteilung auf der Oberfläche der Primärzellen zeigte keine Unterschiede: Bei 4^oC war die Fluoreszenz fleckförmig auf der Zelloberfläche verteilt, während sich bei 37^oC innerhalb von 90 min eine fluoreszierende Kappe ausbildete. Durch Abschilferung von Membranteilen war bei über 90% dieser Zellen nach 2 h die Fluoreszenz von der Zelloberfläche verschwunden. In einigen Fällen waren bei den Milzlymphozyten und den Knochenmarksmakrophagen nach 2 h deutlich fluoreszierende Vakuolen zu beobachten. Dieser Befund deutet auf eine Internalisierung des membrangebundenen Lipopeptids hin. Eine genauere Analyse des internalisierten FITC-Lipopep-

tids konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht durchgeführt werden.

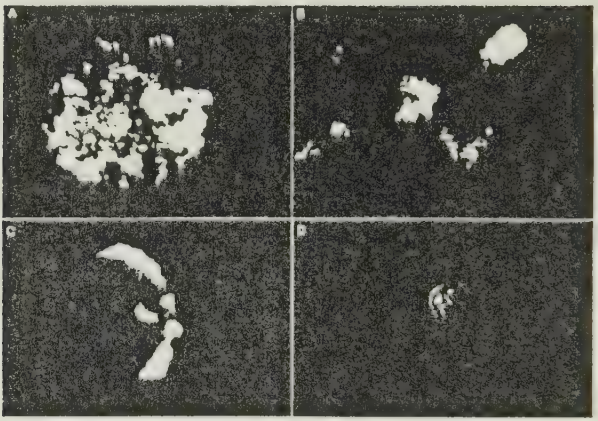

Abb. 6: Verteilung des FITC-Lipopeptids auf der Zelloberfläche von Tumorzellen. Jeweils 1,5 x 10^6 Zellen wurden mit 0,038 mg/ml des FITC-Lipopeptids 30 min bei 37°C inkubiert und nach dem Waschen im Brutschrank kultiviert.
A-C Verschiedene Stadien der Verteilung des FITC-Lipopeptids auf der Zelloberfläche einer B-Lymphomzelle
D Kappenbildung bei einer Mastocytomzelle

4.2.2 FACS-Bindungsanalyse von FITC-Lipopeptid markierten Tumorzellen

Wie die vorangegangenen Experimente zeigten, besteht zwischen der Bindung von Lipopeptiden an Tumorzellen und an die entsprechenden Primarzellen kein Unterschied. Da es sich bei Zellinien um nahezu homogene Populationen handelt, wurde die quantitative Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität einzelner Zellen mit Tumorzellen durchgeführt. Dazu wurden die Tumorlinien BCl_1,

P815 und $P388D_1$ mit unterschiedlichen Konzentrationen des FITC-Lipopeptids markiert und im FACS II analysiert. Um eine mögliche Endocytose des membrangebundenen Lipopeptids auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die Zellen bei 4°C in Gegenwart von Natriumazid inkubiert. Tote Zellen, die sich von vitalen Zellen auch durch ihre Lichtstreuungseigenschaften unterscheiden, wurden zusätzlich mit Propidiumjodid markiert und nicht weiter analysiert.

Die Auswertung der FACS-Analyse bestätigte, daß mit steigender Konzentration des FITC-Lipopeptids die Intensität der zellgebundenen Fluoreszenz zunahm. Während unmarkierte Zellen eine geringe Eigenfluoreszenz zeigten, war das Fluoreszenzmaximum der markierten B-Lymphomzellen in allen Experimenten (n = 3) bei einer Lipopeptidkonzentration von 10 µg/ml (5×10^{-6} M) merklich verschoben. Bei den T-Lymphomzellen und den Mastocytomzellen war in zwei von drei Experimenten hier keine erhöhte Fluoreszenz zu beobachten, sondern erst bei einer Verdopplung der Lipopeptidkonzentration (Abb. 7).
Eine Sättigung der Fluoreszenz konnte bei keiner der untersuchten Zellinien erzielt werden, da das Lipopeptid bei Konzentrationen über 70 µg/ml eine zellschädigende Wirkung besaß und somit eine weitere Analyse verhinderte. Aufgrund der starken Fluoreszenz der markierten Zellen konnte außerdem aus gerätetechnischen Gründen die Lipopeptidkonzentration nicht beliebig erhöht werden.

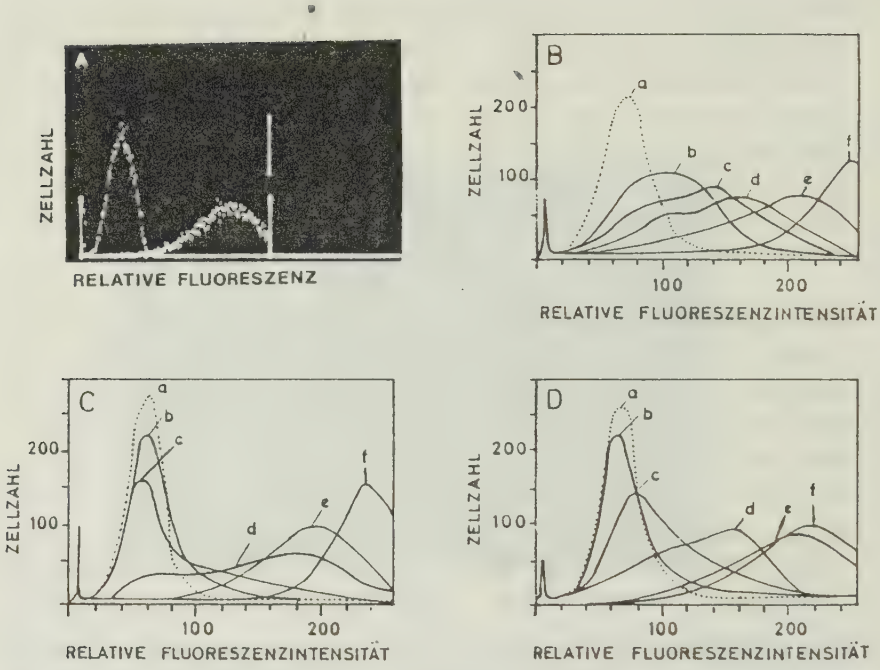

Abb. 7: FACS-Analyse verschiedener Tumorzellen nach Markierung mit $Pam_3Cys\text{-}Ser\text{-}(Lys)_4(FITC)_{2-4}\text{-}OH$. Je 1,5 x 10^6 Zellen wurden mit 10 bis 95 µg/ml FITC-Lipopeptid 30 min bei 4°C inkubiert und nach dem Waschen mit Propidiumjodid versetzt. Je 10 000 vitale Zellen wurden analysiert. Es wurden folgende Lipopeptidkonzentrationen eingesetzt (in µg/ml):

a) 0 b) 9,5 c) 19 d) 38 e) 76 f) 95

A Histogramm von BCl_1-Zellen vor und nach der Markierung mit 0,038 mg/ml FITC-Lipopeptid

B Histogramme von markierten BCL_1-Zellen

C Histogramme von markierten $P388D_1$-Zellen

D Histogramme von markierten P815-Zellen

4.3 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf Wachstum und Differenzierung der promyeloischen Leukämimiezellinie HL-60

4.3.1 Kultivierung von HL-60 in Gegenwart verschiedener Differenzierungsinduktoren

Es sollte untersucht werden, ob durch synthetische Lipopeptide bei der promyeloischen Leukämiezellinie HL-60 eine Proliferationsinhibition und eine Differenzierung zu Granulozyten oder Makrophagen-ähnlichen Zellen ausgelöst werden kann. Dazu wurden die HL-60 Zellen in Gegenwart unterschiedlicher TPP-Konzentrationen mehrere Tage kultiviert. Weiterhin sollte die Wirkung von TPP mit der Wirksamkeit von LPS auf diesen HL-60 Klon verglichen werden. Zur internen Kontrolle wurden die Zellen in Gegenwart von Dimethylsulfoxid kultiviert.
Diese Experimente wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Ranjit Bhardwaj durchgeführt.

In Abb. 8 ist der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Proliferation der promyeloischen Zellinie HL-60 zusammengefaßt. Daraus ist ersichtlich, daß die Wirkung von TPP abhängig von der Dosis und der Expositionsdauer ist. TPP zeigte bei einer Konzentration von 10 µg/ml bis zum fünften Tag im Vergleich zur Kontrollkultur keinen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation, während es in höheren Konzentrationen (100 µg/ml) schon nach 72 h deutlich wirksam war. Die Hemmung betrug etwa 37% am Tag 3 und 43% am Tag 7. Toxische Effekte von TPP konnten bei den in diesen Experimenten verwendeten Konzentrationen ausgeschlossen werden, da in allen untersuchten Kulturen die Vitalität der Zellen über 90% lag. Allerdings war es nicht möglich, die Zellproliferation vollständig zu hemmen. Dieser Befund deutet an, daß die promyeloischen Leukämiezellen nach Zusatz von synthetischen Lipopeptiden die Fähigkeit zur unkontrollierten Vermehrung teilweise verlieren.

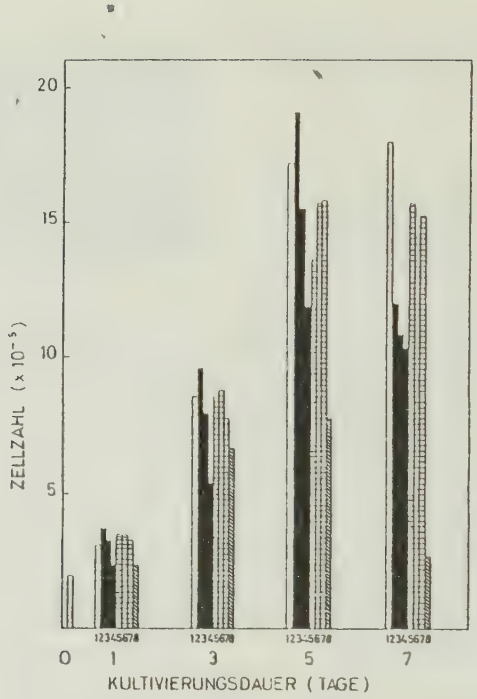

Abb. 8: Wachstum der promyeloischen Zellinie HL-60 in Gegenwart verschiedener Differenzierungsinduktoren. Je 2 x 10^5 Zellen wurden in 1,5 ml-Kulturen mit TPP (10;50; 100 µg/ml), LPS (0,1;5;30 µg/ml) und 1,25% Dimethylsulfoxid versetzt und 1, 3, 5 und 7 Tage kultiviert. Zellzahl und Vitalität wurden durch Trypanblau-Ausschlußfärbung bestimmt.

LPS wirkte auf diesen HL-60 Klon bei den eingesetzten Konzentrationen ähnlich wie TPP, wobei die hemmende Wirkung auf das Zellwachstum allerdings deutlich weniger stark ausgeprägt war. Die Hemmung betrug am Tag 7 etwa 20% im Vergleich zur Kontrolle.

Die Behandlung der Promyelozyten mit 1,25% Dimethylsulfoxid führte schon nach 24 h zu einer sichtbaren Verringerung der Proliferationsrate. Besonders deutlich zeigte sich dieser inhibitorische Effekt nach 5 Tagen. Die Wachstumshemmung lag im Vergleich zur Kontrolle bei 55% und erhöhte sich bis zum Tag 7 auf 85%. Dennoch war bei diesem HL-60 Klon eine vollständige Proliferationshemmung mit Dimethylsulfoxid nicht zu erzielen.

4.8.2 Morphologische Veränderungen

In den vorangegangen Experimenten konnte gezeigt werden, daß neben Dimethylsulfoxid und LPS auch TPP in höheren Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation der humanen promyeloischen Leukämiezellinie HL-60 hat. Von LPS und Dimethylsulfoxid ist bekannt, daß beide Substanzen eine Differenzierung der Promyelozyten zu Granulozyten oder zu Makrophagen-ähnlichen Zellen auslösen. Im folgenden sollte daher untersucht werden, welche morphologischen Veränderungen nach Zusatz von TPP bei den Zellen auftreten. Dazu wurden die Promyelozyten mit den TPP-, LPS- und Dimethylsulfoxidkonzentrationen versetzt, die eine deutliche deutliche Proliferationshemmung induzierten, und fünf bzw. sieben Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträger transferiert und nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald- und Giemsafärbung) angefärbt. Es wurden folgende Veränderungen untersucht: Zellgestalt, Zell-/Kernvolumen, Kernform sowie Ausbildung von Granula. In Tab. 8 sind diese Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 8: Morphologische Veränderungen nach der Kultivierung von HL-60 Zellen in Gegenwart von TPP, LPS und Dimethylsulfoxid. Die Zellen wurden nach Pappenheim angefärbt.

Stimulus	Morphologische Veränderungen	
	Tag 5	Tag 7
TPP	große Kerne mit Nucleoli, Cytoplasmaraum vergrößert; violette Granula	große, einheitlich geformte Kerne; polar angeordnete Vesikel
LPS	große, runde Kerne; violette Granula; basophiles Cytoplasma;	große Kerne; nicht deutlich polar angeordnete Vesikel
Dimethylsulfoxid	Kernverformungen; basophiles Cytoplasma	Kernform wie junger Granulozyt; keine Vesikel
Kontrolle	vereinzelt Kernaufhellungen; vereinzelte Vesikel; violette Granula	

4.8.3 Immunhistologische Charakterisierung der morphologisch veränderten Zellen

Reife Granulozyten unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch in ihren Oberflächendeterminanten von den weniger differenzierten Vorstufen. Im Gegensatz zu Promyelozyten exprimieren sie auf ihrer Oberfläche das unspezifisch mit dem karzinoembryonale Antigen kreuzreagierende Antigen (NCA). Bisher ist nicht bekannt, in welchem Differenzierungsstadium dieses Membranprotein von den Zellen exprimiert wird. In den vorangegangenen Experimenten konnten morphologische Veränderungen, insbesondere des Zellkerns, nach der Kultivierung von HL-60 Zellen in Gegen-

wart von TPP, LPS und Dimethylsulfoxid nachgewiesen werden. Im folgenden sollte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers untersucht werden, ob bei diesen veränderten Zellen durch die verschiedenen Differenzierungsinduktoren die Expression des NCA-Antigens auf der Zelloberfläche ausgelöst wird. Dazu wurden die Promyelozyten fünf bzw. sieben Tage im Gegenwart optimaler Konzentrationen von TPP, LPS und Dimethylsulfoxid kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträgern immunhistologisch auf NCA-Expression untersucht. Die Gegenfärbung der Zellen erfolgte mit Hämalaun.

In Tab. 9 ist die immunhistologische und morphologische Untersuchung der HL-60 Zellen nach Kultivierung mit TPP, LPS und Dimethylsulfoxid zusammengefaßt. Durch keinen dieser Differenzierungsinduktoren konnte eine NCA-Expression der Zellen ausgelöst werden. Einige morphologische Veränderungen, die für eine Differenzierung der Promyelozyten sprechen, waren zusätzlich nach Hämalaunfärbung sichtbar.

Tab. 9: Morphologische Veränderungen nach der Kultivierung von HL-60 Zellen in Gegenwart von TPP, LPS und Dimethylsulfoxid. Die Zellen wurden mit Hämalaun angefärbt.

Stimulus	Morphologische Veränderungen	
	Tag 5	Tag 7
TPP	Zellen vergrößert Kerne verformt und vergrößert; Vesikelaggregate	Zellen vergrößert Kerne aufgebläht und verformt
LPS	Kerne vergrößert, einige verformt, Vesikelaggregate selten	Kerne vergrößert einige verformt
Dimethylsulfoxid	Kernverformungen: gelappt, eingekerbt	sehr deutliche Kernverformungen: stab-, segment-, ringförmig
Kontrolle	große, einheitlich geformte Kerne	

Aus diesen Gesamtdaten ergibt sich, daß unter dem Einfluß von TPP, LPS und Dimetylsulfoxid eine Differenzierung der Promyelozyten zu reiferen Formen der myeloischen Reihe ausgelöst wird. Diese Differenzierung verläuft allerdings nur unvollständig und nicht immer bis zum reifen Granulozyten oder zu Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Zellen. In Tab. 10 und in Abb. 9 sind alle Ergebnisse noch einmal zusammengefaßt.

Tab. 10: Auswertung der Veränderungen von HL-60 Zellen nach der Kultivierung in Gegenwart von TPP, LPS und Dimethylsulfoxid.

Stimulus	Differenzierungsstadien
TPP	myelozytäre, metamyelozytäre und monozytäre Formen
LPS	Myelozyten, ev. Metamyelozyten
Dimethyl-sulfoxid	neutrophile Granulozyten (verschiedene Stadien)
Kontrolle	Promyelozyten

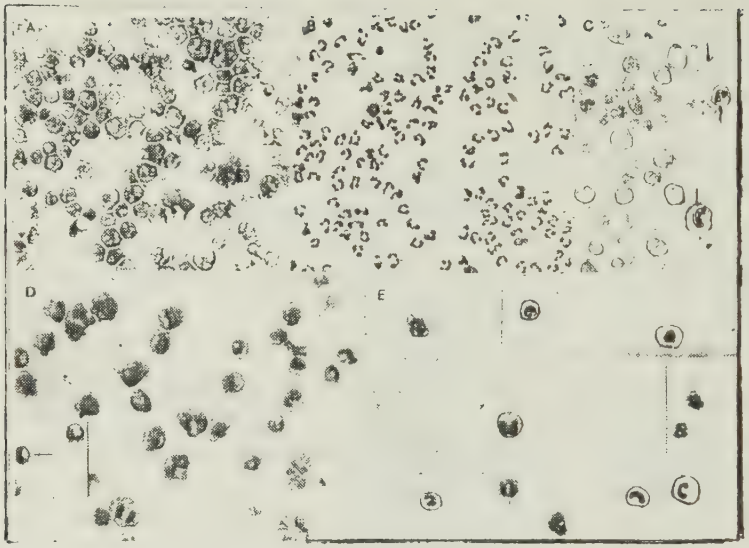

Abb. 9: Übersicht über die verschiedenen Differenzierungsstadien nach der Kultivierung von Promyelozyten in Gegenwart von TPP, LPS und Dimethylsulfoxid. Die Anfärbung der Zellen erfolgte nach Pappenheim oder mit Hämalaun.

A HL-60
B Granulozyten aus peripherem Blut
C HL-60 mit 0,1 mg/ml TPP, 5 Tage kultiviert
D HL-60 mit 0,03 mg/ml LPS, 7 Tage kultiviert
E HL-60 mit 1,25% Dimethylsulfoxid, 7 Tage kultiviert

4.4 Metabolische Markierung von Lymphozyten unter dem Einfluß von TPP und LPS

4.4.1 ^{32}P-Orthophosphateinbau in aktivierte B-Lymphozyten

Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen von Proteinen spielen bei der Aktivierung und Teilung von Zellen eine

wichtige Rolle. Da ruhende B-Lymphozyten sich durch bakterielle Zellwandbestandteile sowie deren synthetische Analoga aktivieren lassen, sollte der Einfluß dieser Substanzen auf die Phosphorylierung von Membran- und cytoplasmatischen Proteinen untersucht werden. Ruhende B-Lymphozyten wurden durch Auftrennung von Milzzellen athymischer Mäuse (C57BL/6 nu/nu) in einem diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten isoliert. Die so gewonnenen Zellen wurden in einem phosphatfreien Medium in Gegenwart von TPP bzw. LPS 4 h aktiviert und dabei mit 0,2 mCi (^{32}P)Orthophosphat markiert. Nach dem Waschen der markierten Zellen wurde die Radioaktivität von einem Aliquot des Gesamtlysats bestimmt, desgleichen von einem Aliquot der mit Triton X-114 angereicherten Membranfraktion.

Tab. 11: Einbau von (^{32}P)Phosphat in TPP- und LPS-aktivierte B-Lymphozyten

Mitogen	Gesamteinbau (cpm)	Gesamteinbau/ Zelle (cpm)	Membraneinbau (cpm)	Membraneinbau % von Gesamt
--	$1{,}89 \times 10^7$	3	$8{,}41 \times 10^5$	4,5%
LPS	$2{,}17 \times 10^7$	4	$8{,}04 \times 10^5$	3,7%
TPP	$3{,}21 \times 10^7$	6	$1{,}15 \times 10^6$	3,6%
--	$1{,}27 \times 10^7$	2	$7{,}39 \times 10^5$	5,8%
LPS	$1{,}48 \times 10^7$	2	$8{,}75 \times 10^5$	5,9%
TPP	$1{,}98 \times 10^7$	3	$9{,}15 \times 10^5$	4,6%
--	$1{,}27 \times 10^7$	6	$1{,}81 \times 10^5$	1,4%
LPS	$1{,}32 \times 10^7$	7	$1{,}96 \times 10^5$	1,5%
TPP	$1{,}10 \times 10^7$	6	$2{,}88 \times 10^5$	2,6%

In Tab. 11 ist der Einbau von (^{32}P)Orthophosphat in mitogenaktivierte B-Lymphozyten aus drei unabhängig voneinander durchge-

führten Experimenten zusammengefaßt. Radioaktives Phosphat findet sich nicht nur in Phosphoproteinen, sondern vor allem in Phospholipiden und Nucleotiden. Von ruhenden B-Lymphozyten wurden durchschnittlich 3,6 cpm/Zelle eingebaut, nach LPS-Aktivierung 4,3 cpm/Zelle und nach TPP-Aktivierung 5 cpm/Zelle. Die Radioaktivitätsmenge in der Membranfraktion unterschied sich bei ruhenden und aktivierten B-Lymphozyten nicht signifikant: 3,9% der Gesamtradioaktivität bei ruhenden B-Zellen, 3,7% bei LPS- und 3,6% bei TPP-aktivierten B-Lymphozyten.

4.4.2 ^{32}P-Orthophosphateinbau in B-Lymphoblasten

Ruhende B-Lymphozyten von C57BL/6 (nu/nu)-Mäusen wurden 40 h polyklonal mit TPP bzw. LPS aktiviert. Nach dem Abtrennen der toten Zellen wurden die B-Lymphoblasten 4 h in Gegenwart von LPS bzw. TPP mit 0,2 mCi (^{32}P)Orthophosphat markiert.

Tab. 12: Einbau von (^{32}P)Orthophosphat in TPP- und LPS-aktivierte B-Lymphoblasten

Mitogen	Gesamteinbau (cpm)	Gesamteinbau/ Zelle (cpm)	Membraneinbau (cpm)	Membraneinbau % von Gesamt
LPS	$1{,}05 \times 10^8$	26	$8{,}40 \times 10^6$	8,0%
TPP	$1{,}66 \times 10^8$	45	$1{,}35 \times 10^7$	8,1%
LPS	$1{,}81 \times 10^8$	22	$1{,}21 \times 10^7$	6,7%
TPP	$1{,}18 \times 10^8$	15	$5{,}90 \times 10^6$	5,0%
LPS	$2{,}50 \times 10^7$	23	$6{,}65 \times 10^5$	2,7%
TPP	$6{,}16 \times 10^7$	40	$2{,}73 \times 10^6$	4,4%

In Tab. 12 ist der Einbau von (^{32}P)Orthophosphat in LPS- und TPP aktivierte B-Lymphoblasten aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten zusammengefaßt. Im Vergleich zu den 4 h mit LPS aktivierten B-Zellen wurde von den LPS-Lymphoblasten etwa die sechsfache Radioaktivitätsmenge eingebaut, nämlich 24 cpm/Zelle. Bei den TPP-Blasten erfolgte mit 33 cpm/Zelle ein etwa siebenfach höherer Phosphateinbau als bei den 4 h mit TPP aktivierten Lymphozyten. In die Membranfraktion der LPS- und TPP-Blasten wurden 5,8% der Gesamtradioaktivität eingebaut und damit etwa 60% mehr als bei der Aktivierung ruhender B-Lymphozyten.

4.4.3 ^{32}P-Orthophosphateinbau in aktivierte Milzzellen

Milzzellen verschiedener Mausstämme wurden 40 h polyklonal aktiviert und nach dem Abtrennen der toten Zellen 4 h mit (^{32}P)Orthophosphat in Gegenwart von LPS bzw. TPP markiert.

In Tab. 13 ist der Einbau von (^{32}P)Orthophosphat in LPS- und TPP-aktivierte Milzlymphozyten verschiedener Mausstämme zusammengefaßt. Verglichen werden sollten ein LPS-Nonresponder- und zwei damit verwandte LPS-Responderstämme, von denen einer keine reifen T-Lymphozyten besitzt. In die LPS- und TPP-Blasten aus C57BL/6-Mäusen wurde im Durchschnitt eine geringere Phosphatmenge eingebaut (20 cpm/Zelle) als in die entsprechenden B-Lymphoblasten der Nacktmäuse C57BL/6 (nu/nu) (28 cpm/Zelle). In Milzlymphozyten des LPS-Nonresponderstammes C57BL/10.Sc.Cr wurde in Gegenwart von LPS dagegen nur wenig radioaktives Phosphat eingebaut (5 cpm/Zelle), während sich der Einbau nach TPP-Stimulation beim LPS-Nonresponder- und Responderstamm nicht unterschied (17 cpm/Zelle). In die Membranfraktion der verschiedenen Mausstämme wurde eine nahezu konstante Menge der Gesamtradioaktivität eingebaut (im Durchschnitt etwa 4%).

Tab. 13: Einbau von (^{32}P)Orthophosphat in LPS- und TPP-aktivierte Milzlymphozyten

Mausstamm	Mitogen	Gesamteinbau (cpm)	cpm/ Zelle	Membraneinbau (cpm)	Membraneinb. % von Gesamt
	LPS	$3,85 \times 10^7$	29	$1,65 \times 10^6$	4,3%
C57BL/6	LPS	$4,50 \times 10^7$	33	$1,94 \times 10^6$	4,3%
nu/nu	TPP	$8,37 \times 10^7$	25	$2,61 \times 10^6$	3,1%
	LPS	$1,54 \times 10^8$	24	$4,97 \times 10^6$	3,2%
C57BL/6	LPS	$1,06 \times 10^8$	16	$4,33 \times 10^6$	4,1%
	TPP	$2,93 \times 10^7$	12	$1,82 \times 10^6$	6,2%
	TPP	$6,58 \times 10^7$	26	$2,70 \times 10^6$	4,1%
	LPS	$1,45 \times 10^7$	8	$5,64 \times 10^5$	3,9%
C57BL/10.	LPS	$0,61 \times 10^7$	3	$2,85 \times 10^5$	4,5%
Sc.Cr	TPP	$3,31 \times 10^7$	13	$0,95 \times 10^6$	2,9%
	TPP	$5,37 \times 10^7$	21	$2,83 \times 10^6$	5,3%

4.4.4 ^{35}S-Methionineinbau in aktivierte B-Lymphozyten

Ruhende B-Lymphozyten von C57BL/6 nun/nu-Mäusen wurden in Gegenwart von LPS bzw. TPP in einem methioninfreien Medium 4 h und 8 h mit 0,2 mCi (^{35}S)Methionin inkubiert. Dadurch wurden alle methioninhaltigen Proteine, die innerhalb dieser Zeit neusynthetisiert wurden, radiomarkiert.

Tab. 14: Einbau von (^{35}S)Methionin in mitogenaktivierte B-Lymphozyten

Zeit	Mitogen	Gesamteinbau (cpm)	cpm/ Zelle	Membraneinbau (cpm)	Membraneinbau % von Gesamt
	--	$1{,}80 \times 10^7$	9	$1{,}12 \times 10^6$	6,3%
4 h	LPS	$2{,}53 \times 10^7$	12	$1{,}92 \times 10^6$	7,6%
	TPP	$2{,}57 \times 10^7$	13	$2{,}29 \times 10^6$	8,9%
	--	$3{,}42 \times 10^7$	17	$3{,}54 \times 10^6$	10,3%
8 h	LPS	$3{,}70 \times 10^7$	19	$3{,}91 \times 10^6$	10,6%
	TPP	$5{,}13 \times 10^7$	25	$5{,}10 \times 10^6$	9,9%

In Tab. 14 ist der Einbau von radioaktivem Methionin in LPS- und TPP-aktivierte B-Lymphozyten zusammengefaßt. Die von den Zellen aufgenommene Gesamtradioaktivitätsmenge erhöhte sich linear mit der Markierungsdauer und war nach 8 h etwa doppelt so hoch wie nach 4 h. Von den mitogenstimulierten B-Lymphozyten wurde pro Zelle mehr radioaktives Methionin eingebaut als von den nicht aktivierten Zellen, wobei der Gesamteinbau nach TPP-Aktivierung höher lag als nach LPS-Stimulation. In die Membranproteine der aktivierten Lymphozyten wurden während der vierstündigen Markierung etwa 8% der Gesamtradioaktivität eingebaut; nach 8 h erhöhte sich der Anteil auf 10%

4.4.5 ^{35}S-Methionineinbau in B-Lymphoblasten

Ruhende B-Lymphozyten von C57BL/6 nu/nu-Mäusen wurden 40 h mit LPS bzw. TPP polyklonal aktiviert. Nach Abtrennung der toten Zellen wurden die B-Lymphoblasten in methioninfreiem Medium 4 h mit 0,2 mCi (^{35}S)Methionin in Gegenwart von LPS bzw. TPP markiert.

Tab. 15: Einbau von (^{35}S)Methionin in B-Lymphoblasten

Mitogen	Gesamteinbau (cpm)	Gesamteibau/ Zelle (cpm)	Membraneinbau (cpm)	Membraneinbau % von Gesamt
LPS	$3,07 \times 10^7$	30	$2,23 \times 10^6$	7,3%
TPP	$7,41 \times 10^7$	41	$9,90 \times 10^6$	13,3%
LPS	$5,70 \times 10^7$	29	$7,80 \times 10^6$	13,7%
	$6,90 \times 10^7$	35	$4,01 \times 10^6$	5,8%
TPP	$6,46 \times 10^7$	32	$4,74 \times 10^6$	7,3%
	$5,65 \times 10^7$	28	$5,62 \times 10^6$	9,9%

In Tab. 15 ist der Einbau von radioaktivem Methionin in LPS- und TPP-aktivierte B-Lymphoblasten zusammengefaßt. Von den LPS-Blasten wurden im Durchschnitt 31 cpm/Zelle eingebaut, von den TPP-Blasten 34 cpm/Zelle. Diese Einbauraten sind etwa 2,5-fach höher als bei den mitogenaktivierten B-Lymphozyten nach vierstündiger Markierungsdauer und etwa 1,5-fach höher als bei B-Zellen, die 8 h aktiviert wurden. In die mittels Triton X-114 angereicherten Membranproteine wurden von den LPS-Lymphoblasten im Durchschnitt 9%, von den TPP-Blasten etwa 10% der Gesamtradioaktivität eingebaut.

4.4.6 ^{35}S-Methionineinbau in aktivierte Milzzellen

Milzzellen verschiedener Mausstämme wurden 40 h polyklonal mit LPS bzw. TPP aktiviert und nach dem Abtrennen der toten Zellen in einem methioninfreien Medium 4 h mit 0,2 mCi (^{35}S)Methionin in Gegenwart von LPS bzw. TPP markiert.

Tab. 16: Einbau von (^{35}S)Methionin in mitogenaktivierte Milzlymphozyten

Mausstamm	Mitogen	Gesamteinbau (cpm)	cpm/ Zelle	Membraneinbau (cpm)	Membraneinbau % von Gesamt
	LPS	$0,95 \times 10^7$	5	$0,92 \times 10^6$	9,7%
C57BL/6	LPS	$1,13 \times 10^7$	7	$1,00 \times 10^6$	7,6%
nu/nu	TPP	$4,08 \times 10^7$	20	$3,72 \times 10^6$	9,1%
	TPP	$7,02 \times 10^7$	35	$5,52 \times 10^6$	7,9%
	LPS	$3,50 \times 10^7$	18	$3,03 \times 10^6$	8,7%
C57BL/6	LPS	$4,67 \times 10^7$	22	$3,05 \times 10^6$	6,8%
	TPP	$7,24 \times 10^7$	36	$6,22 \times 10^6$	8,6%
	TPP	$5,21 \times 10^7$	26	$3,57 \times 10^6$	6,9%
	LPS	$2,67 \times 10^7$	13	$2,87 \times 10^6$	10,7%
C57BL/10.	LPS	$2,59 \times 10^7$	13	$2,37 \times 10^6$	9,1%
Sc.Cr	TPP	$7,84 \times 10^7$	39	$1,02 \times 10^7$	12,9%
	TPP	$5,32 \times 10^7$	27	$7,25 \times 10^6$	13,6%
C57BL/6	LPS	$2,62 \times 10^7$	10	$3,30 \times 10^6$	12,6%
	TPP	$4,79 \times 10^7$	19	$4,09 \times 10^6$	8,5%
C57BL/10.	TPP	$5,78 \times 10^7$	23	$6,35 \times 10^6$	11,0%
Sc.Cr	TPP	$5,96 \times 10^7$	24	$6,23 \times 10^6$	10,4%
C57BL/6	LPS	$2,00 \times 10^7$	10	$1,17 \times 10^6$	5,9%
nu/nu	TPP	$2,34 \times 10^7$	12	$0,89 \times 10^6$	3,8%

In Tab. 16 ist der Einbau von radioaktivem Methionin in LPS- und TPP-aktivierte Milzlymphozyten verschiedener Mausstamme zusammengefaßt. Es sind zwei unabhangig voneinander durchgefuhrte Experimente dargestellt. Die pro Zelle eingebaute Radioaktivitatsmenge lag nach TPP-Aktivierung in allen getesteten Maus-

stämmen höher als nach LPS-Aktivierung. In Gegenwart von LPS wurden in Milzzellen des LPS-Nonresponderstammes C57BL/10.Sc.Cr 13 cpm/Zelle eingebaut; dieser Wert war damit nur wenig geringer als beim LPS-Responderstamm. Im Gegensatz zum Phosphateinbau war der Methionineinbau in die mitogenstimulierten Milzlymphozyten von Nacktmäusen niedriger als in die Lymphoblasten, die nach Aktivierung von ruhenden B-Lymphozyten gewonnen wurden. In die Membranproteine der LPS-aktivierten Zellen wurden bei den getesteten Mausstämme durchschnittlich zwischen 8% und 10% der Gesamtradioaktivität eingebaut, in die TPP-stimulierten Zellen zwischen 8% (C57BL/6 nu/nu und C57BL/6) und 11% (C57BL/10.Sc.Cr). Trotz eines geringeren Gesamteinbaus von radioaktivem Methionin in die aktivierten Milzlymphozyten entsprach der Anteil der markierten Membranproteine dem der B-Lymphoblasten (C57BL/6 nu/nu).

4.4.7 ^{35}S-Sulfateinbau in B-Lymphoblasten

Ruhende B-Lymphozyten von C57BL/6 nu/nu-Mäusen wurden 40 h polyklonal mit LPS bzw. TPP aktiviert. Nach dem Abtrennen der toten Zellen wurden die Lymphoblasten in einem sulfatfreien Medium 4 h mit 0,2 mCi (^{35}S)Sulfat inkubiert. Durch diese Methode gelingt es, den Einfluß der B-Zell-Mitogene TPP und LPS auf die Sulfatidierung von Membranproteinen aktivierter B-Lymphozyten zu untersuchen.

Tab. 17: Einbau von (^{35}S)Sulfat in LPS- und TPP-Lymphoblasten

Mitogen	Gesamteinbau (cpm)	Gesamteinbau/ Zelle (cpm)	Membraneinbau (cpm)	Membraneinbau % von Gesamt
LPS	$4{,}00 \times 10^5$	0,10	$2{,}57 \times 10^4$	6,4%
TPP	$8{,}13 \times 10^5$	0,35	$2{,}93 \times 10^4$	3,6%
LPS	$2{,}67 \times 10^5$	0,24	$7{,}34 \times 10^3$	2,7%
TPP	$4{,}01 \times 10^5$	0,26	$1{,}04 \times 10^4$	2,6%
LPS	$1{,}26 \times 10^5$	0,06	$2{,}77 \times 10^3$	2,2%
LPS	$8{,}53 \times 10^4$	0,04	$3{,}06 \times 10^3$	3,6%
TPP	$1{,}48 \times 10^5$	0,07	$6{,}29 \times 10^3$	4,2%
TPP	$2{,}76 \times 10^5$	0,14	$1{,}73 \times 10^4$	6,2%

In Tab. 17 ist der Einbau von radioaktivem Sulfat in LPS- und TPP-Lymphoblasten zusammengefaßt. Es sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Die pro Zelle eingebaute Radioaktivitätsmenge lag bei den Lipopeptid-stimulierten Blasten höher als bei den LPS-stimulierten Zellen: Von den TPP-Blasten wurden im Durchschnitt 0,21 cpm/Zelle eingebaut, von den LPS-Blasten 0,11 cpm/Zelle. In die Membranfraktion wurden nach Aktivierung mit LPS 3,7%, nach TPP-Aktivierung 4,2% der Gesamtradioaktivität eingebaut.

4.4.8 ^{35}S-Sulfateinbau in aktivierte Milzzellen

Milzlymphozyten verschiedener Mausstämme wurden 40 h polyklonal mit LPS bzw. TPP aktiviert und nach dem Abtrennen der toten Zellen in sulfatfreiem Medium mit 0,2 mCi (^{35}S)Sulfat in Gegenwart von LPS bzw. TPP 4 h markiert.

Tab. 18: ^{35}S-Sulfateinbau in LPS- und TPP-aktivierte Milzlymphozyten

Mausstamm	Mitogen	Gesamteinbau (cpm)	cpm/ Zelle	Membraneinbau (cpm)	Membraneinbau % von Gesamt
	LPS	$6,46 \times 10^5$	0,47	$2,06 \times 10^4$	3,2%
C57BL/6	LPS	$9,41 \times 10^5$	0,69	$2,69 \times 10^4$	2,9%
nu/nu	TPP	$1,17 \times 10^6$	0,35	$2,87 \times 10^4$	2,5%
	TPP	$1,81 \times 10^5$	0,10	$0,84 \times 10^4$	4,7%
C57BL/6	TPP	$9,11 \times 10^5$	0,36	$5,32 \times 10^4$	5,8%
	TPP	$7,38 \times 10^5$	0,29	$4,99 \times 10^4$	6,8%
	LPS	$7,30 \times 10^5$	0,37	$2,90 \times 10^4$	4,0%
C57BL/10.	LPS	$5,72 \times 10^5$	0,29	$2,39 \times 10^4$	4,2%
Sc.Cr	TPP	$7,04 \times 10^5$	0,28	$4,83 \times 10^4$	6,7%
	TPP	$1,26 \times 10^6$	0,50	$5,82 \times 10^4$	4,6%
C57BL/6	LPS	$9,77 \times 10^5$	0,20	$1,30 \times 10^4$	1,3%
	TPP	$1,27 \times 10^6$	0,25	$1,87 \times 10^4$	1,5%

In Tab. 18 ist der Einbau von radioaktivem Sulfat in LPS- und TPP-aktivierte Milzlymphozyten verschiedener Mausstämme zusammengefaßt. Die pro Zelle eingebaute Radioaktivitätsmenge lag bei allen getesteten Stämmen sowohl nach LPS- als auch nach TPP-Stimulation zwischen 0,3 und 0,4 cpm/Zelle. In die Membranfraktion wurde von den LPS-aktivierten Milzzellen durchschnittlich etwas weniger Sulfat eingebaut als von den TPP-aktivierten Zellen. Die Einbaurate betrug zwischen 2% und 6% der Gesamtradioaktivitätsmenge.

4.4.9 ^{3}H-Leucineinbau in aktivierte Milzlymphozyten

Milzlymphozyten von Balb/c-Mäusen wurden nach der Lyse der Erythrozyten entweder in serumfreiem oder in serumhaltigem Kulturmedium mit TPP bzw. LPS aktiviert und anschließend in einem leucinfreien Medium mit 0,075 mCi (^{3}H)Leucin/2 bis 4 x 10^{7} Zellen markiert. Da es sich bei TPP und LPS um T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivatoren handelt, sollten durch diese Methode vorwiegend die Proteine der proliferierenden B-Lymphozyten markiert werden.

Tab. 19: Einbau von (^{3}H)Leucin in TPP- und LPS-aktivierte Milzlymphozyten

Medium	Mitogen	Aktivierungsdauer; Markierungsdauer	Gesamteinbau (cpm)	cpm/Zelle
Km[1]	LPS	43 h; 6 h	2,00 x 10^{7}	0,20
Km	TPP	43 h; 6 h	2,02 x 10^{7}	0,14
Km	TPP	24 h; 24 h	7,76 x 10^{7}	0,16
Ax[2]	TPP	22 h; 21 h	9,35 x 10^{7}	0,46
Ax	TPP	22 h; 21 h	1,89 x 10^{7}	0,98

[1]Km: serumhaltiges Kulturmedium
[2]Ax: serumfreies Kulturmedium

In Tab. 19 ist der Einbau von radioaktivem Leucin in TPP- und LPS-aktivierte Milzlymphozyten von Balb/c-Mäusen zusammengefaßt. Es wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet, um eine optimale Aktivierung der B-Lymphozyten und damit eine vermehrte Anreicherung der Lymphoblasten zu erzielen. Weiterhin wurde der Einfluß der Markierungsdauer auf die Höhe der einge-

bauten Radioaktivitätsmenge untersucht. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß sich in serumhaltigem Kulturmedium der ^{3}H-Leucineinbau von TPP- und LPS-aktivierten Milzzellen nicht unterscheidet. Bei der Aktivierung mit dem synthetische Lipopeptid hatte eine Erhöhung der Aktivierungsdauer bei gleichzeitiger Verminderung der Markierungsdauer keinen Einfluß auf die eingebaute Radioaktivitätsmenge. Daher wurden die Zellen bei den weiteren Versuchen 24 h voraktiviert und weitere 24 h radioaktiv markiert.
Wurden die Milzlymphozyten nicht in einem serumhaltigen Kulturmedium, sondern in einem serumfreien Medium voraktiviert, so erhöhte sich nach der anschließenden Markierung die Menge des eingebauten (^{3}H)Leucins auf das Drei- bis Vierfache.

4.5 Analyse der radioaktiv markierten Lymphozytenproteine

4.5.1 Markierung aktivierter Milzzellen mit (^{3}H)Leucin

Es gibt Hinweise, daß nicht alle B-Lymphozyten gegenüber TPP oder LPS reaktiv sind und sich aktivieren lassen. Aufgrund dieser unterscheidbaren Wirkung der Mitogene auf die Zellen sollte untersucht werden, ob LPS- und TPP-aktivierte Milzlymphozyten im Laufe der mitogenen Aktivierung und der Zellteilung unterschiedliche Proteine exprimieren.
Einige dieser Experimente wurden in Zusammenarbeit mit B. Kleine durchgeführt.

Um vorwiegend die Proteine aktivierter und sich teilender Lymphozyten zu markieren, wurden die Milzzellen 24 h in Gegenwart der T-Zell-unabhängigen B-Zell-Mitogene TPP und LPS voraktiviert. Dabei stirbt ein Teil der nichtreaktiven Zellen ab, während sich die reaktiven Zellen anreichern. Durch Zusatz von (^{3}H)Leucin wurden die innerhalb weiterer 24 h neusynthetisierten Proteine radioaktiv markiert. Die Zellen wurden mit Nonidet

P40 lysiert und die Membran- und cytoplasmatischen Proteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.

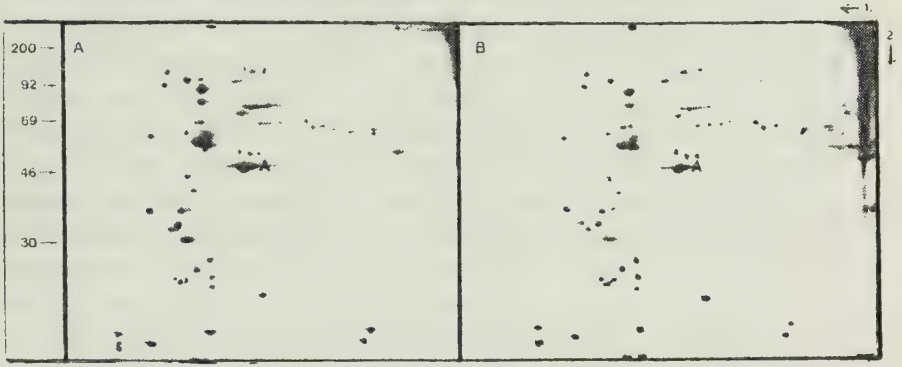

Abb. 10: Zweidimensionale Trennung ^{3}H-Leucin-markierter Proteine von TPP- (A) und LPS-aktivierten (B) Milzzellen (Balb/c). Die Experimente wurden wie in 3.2.5.4 und 3.2.7.1 beschrieben durchgeführt.

In Abb. 10 ist die zweidimensionale Trennung ^{3}H-Leucin-markierter Proteine von TPP- und LPS-aktivierten Balb/c-Milzlymphozyten gezeigt. Nach der mitogenen Aktivierung sind etwa 100 verschiedene Proteine sichtbar. Zu den Proteinen, die markiert wurden, gehören die MHC-Antigene und das Aktin (siehe Markierung). Das Proteinmuster der TPP-aktivierten Zellen unterscheidet sich, soweit dies erkennbar ist, nicht von dem der LPS-aktivierten Zellen.

4.5.2 ^{35}S-Methioninmarkierung aktivierter B-Lymphozyten

Die Analyse der ^{3}H-Leucin-markierten Proteine von TPP- bzw. LPS-aktivierten und sich teilenden Milzlymphozyten des Mausstamms Balb/c ergab nach der zweidimensionalen Trennung keinen Unterschied im Proteinmuster der Gesamtzellproteine. Aufgrund der Vielzahl der markierten Proteine und der Bedeutung der Membranproteine bei der Zellaktivierung sollte daher im weiteren untersucht werden, ob nach einer mitogenen Stimulation mit dem

synthetischen Lipopeptid oder mit LPS von B-Lymphozyten unterschiedliche Membranproteine exprimiert werden.
Für diese Experimente wurden Milzzellen von Nacktmäusen des Stamms C57BL/6 (nu/nu) verwendet, die keine reifen T-Lymphozyten enthalten. Ruhende B-Lymphozyten wurden über einen Percolldichtegradienten angereichert und in Gegenwart von TPP bzw. LPS aktiviert. Wegen der höheren Strahlungsenergie von ^{35}S und der daraus resultierenden besseren Nachweisbarkeit wurde die Markierung der Lymphozytenproteine mit (^{35}S)Methionin durchgeführt statt mit (^{3}H)Leucin. Die Zellen wurden insgesamt 4 h markiert, um Proteine, die auf das Aktivierungssignal hin neusynthetisiert wurden, zu erfassen. Die Membranproteine wurden nach der Bordiermethode (102) isoliert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.

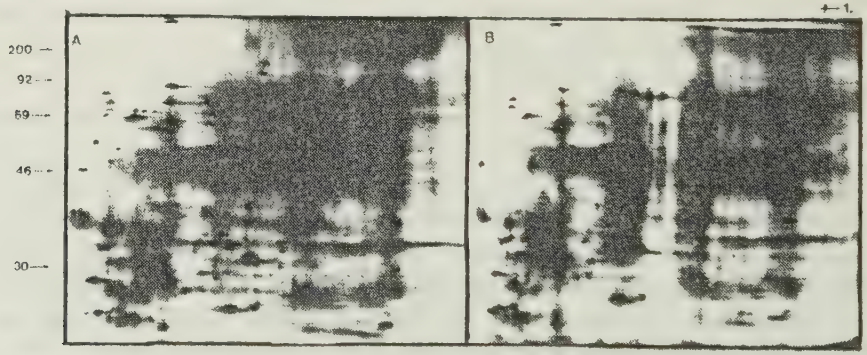

Abb. 11: Zweidimensionale Trennung ^{35}S-Methionin-markierter Membranproteine aus Milzlymphozyten von Nacktmäusen nach 4 h Aktivierung mit TPP (A) bzw. LPS (B). Die Experimente wurden wie in 3.2.5.7 und 3.2.7.1 beschrieben durchgeführt.

In Abb. 11 ist die zweidimensionale Trennung ^{35}S-Methionin-markierter Membranproteine von B-Lymphozyten nach vierstündiger Aktivierung mit TPP und LPS gezeigt. Anhand der Fluorographie sind wenigstens 140 verschiedene Proteinflecken erkennbar. Diese große Anzahl von markierten Membranproteinen erschwerte die Suche nach Unterschieden im Proteinmuster zwischen TPP- und LPS-stimulierten Zellen. Soweit ein direkter Vergleich der sich

entsprechenden Proteinflecken möglich war, konnten keine membrangebundenen Lymphozytenproteine lokalisiert werden, die spezifisch auf das Lipopeptid- oder LPS-Signal hin exprimiert wurden. Falls eine unterschiedliche Expression von Membranproteinen existieren sollte, war diese ohne technische Hilfsmittel (z.B. Computeranalyse) nicht nachweisbar.
Zu den Proteinen, die durch (^{35}S)Methionin markiert wurden, gehörten die MHC-Antigene und mit Membranproteinen assoziiertes Aktin. Alle anderen Proteine konnten aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten nicht identifiziert werden.

4.5.3 ^{35}S-Methioninmarkierung von B-Lymphoblasten

Bei der mitogenen Aktivierung von B-Lymphozyten durch synthetische Lipopeptide oder durch LPS spielen die Membranproteine eine entscheidende Rolle beim Signaltransfer. Im Laufe der Zellaktivierung werden eine Reihe von Proteinen, insbesondere von Rezeptoren für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, neusynthetisiert und auf der Zelloberfläche exprimiert. Daneben kommt es zur Neusynthese von Membranproteinen als Folge einer vorangegangenen Internalisierung dieser Proteine (antigene Modulation). Dazu gehören vor allem Bindungsstellen, an die ein Ligand gebunden hat. Es sollte daher untersucht werden, ob sich bei aktivierten und teilenden B-Lymphozyten Membranproteine nachweisen lassen, die nur nach der Stimulation der Zellen mit dem einen, nicht jedoch mit dem andern Mitogen exprimiert werden.
Die ruhenden B-Lymphozyten von Nacktmäusen (C57BL/6 nu/nu) wurden über einen Percolldichtegradienten angereichert und 40 h mit der optimalen TPP- oder LPS-Konzentration aktiviert. Nach dem Abtrennen der toten Zellen wurden die verbleibenden Zellen, hauptsächlich B-Lymphoblasten, weitere 4 h mit dem jeweiligen Mitogen in Gegenwart von (^{35}S)Methionin aktiviert.

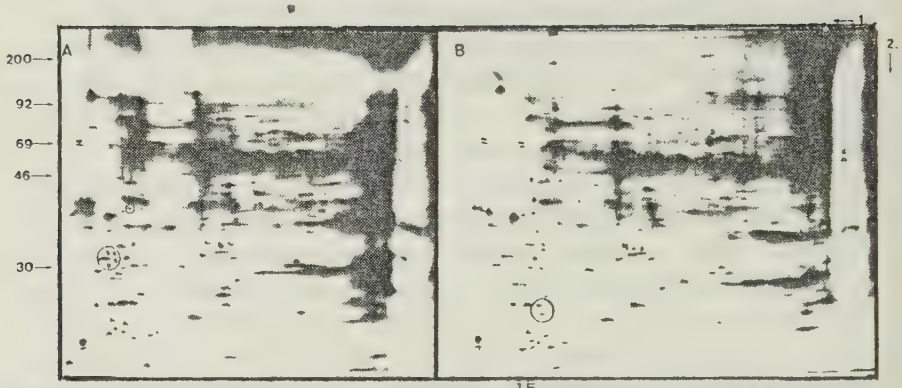

Abb. 12: Zweidimensionale Trennung ^{35}S-Methionin-markierter Membranproteine von TPP- (A) und LPS-Lymphoblasten (B) aus Nacktmäusen. Die Experimente wurden wie in 3.2.5.8 und 3.2.7.1 beschrieben durchgeführt.

In Abb. 12 ist die zweidimensionale Trennung ^{35}S-Methionin-markierter Membranproteine von TPP- und LPS-aktivierten, proliferierenden B-Lymphoblasten gezeigt. Anhand der Fluorographie sind wenigstens 140 verschiedene Proteine zu erkennen. Ein Vergleich des Proteinmusters ergab, daß sowohl von den TPP- als auch von den LPS-aktivierten Zellen nahezu dieselben Membranproteine synthetisiert und auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Bei den Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 3,5 und 4,5 und einer relativen Molekülmasse zwischen 15 kDa und 40 kDa waren allerdings einige Unterschiede erkennbar. Es konnte ein 17 kDa-Protein identifiziert werden, das in diesem Experiment in den Parallelkulturen von den LPS-aktivierten, nicht aber von den TPP-aktivierten Zellen exprimiert wurde (siehe Markierung). Demgegenüber wurden einige Proteine gefunden, die nur von den TPP-Blasten exprimiert wurden: 4 Proteine von etwa 30 kDa und ein Protein von 35 kDa (siehe Markierung). In mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten konnten diese Unterschiede im Proteinmuster von TPP- und LPS-aktivierten Milzlymphozyten athymischer Mäuse allerdings nicht immer bestätigt werden. Während sich entsprechende Proteinflecken anhand der verschiedenen Fluorographien ohne weiteres vergleichen ließen, traten im Bereich der Proteine mit einem

niedrigen isoelektrischen Punkt geringe Heterogenitäten im Proteinmuster auf. Diese Unterschiede variierten von Experiment zu Experiment. Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Befunden, daß von TPP-aktivierten, proliferierenden B-Lymphozyten wahrscheinlich einige Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert werden, die bei einer Stimulation von Lymphozyten mit LPS nicht auftreten (und umgekehrt).

4.5.4 ^{35}S-Methioninmarkierung aktivierter Milzzellen aus verschiedenen Mausstämmen

Frühere Experimente aus unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, daß nicht alle B-Lymphozyten eines Mausstamms gegenüber TPP und LPS reaktiv sind und sich aktivieren lassen. Diese unterschiedliche Wirkung der beiden B-Zell-Mitogene wurde bei der Testung verschiedener Mausstämme auf Mitogenreaktivität bestätigt. Daher sollte untersucht werden, ob von einem LPS-Nonresponder- und zwei damit verwandten LPS-Responderstämmen, von denen einer keine reifen T-Lymphozyten besitzt, nach der mitogen Stimulation der Milzlymphozyten mit TPP oder LPS unterschiedliche Membranproteine exprimiert werden.

In Abb. 13 ist die zweidimensionale Trennung ^{35}S-Methionin-markierter Membranproteine aus TPP- und LPS-aktivierten Milzlymphozyten verschiedener Mausstämme zusammengefaßt. Die Lymphozyten wurden 40 h voraktiviert und nach dem Abtrennen der toten Zellen 4 h in Gegenwart des Mitogens radiomarkiert. Anhand der der Fluorographie konnten wenigstens 140 bis 150 verschiedene Proteine identifiziert werden. Die überwiegende Mehrzahl der Membranproteine, die bei den Nacktmäusen nach mitogener Stimulation der Milzlymphozyten gefunden wurde, war auch beim LPS-Nonresponder- und bei einem weiteren LPS-Responderstamm sichtbar. Dies ist ein weiterer starker Hinweis dafür, daß unter dem Einfluß von TPP und LPS vorwiegend Proteine von B-Lymphozyten, nicht jedoch von T-Lymphozyten markiert werden, obwohl beide Mausstämme (C57BL/6 und C57BL/10.Sc.Cr) funktionsfähige T-Zellen besitzen. Weiterhin zeigte sich, daß die Unterschiede im

Proteinmuster von TPP- und LPS-stimulierten Zellen, die beim Mausstamm C57BL/6 (nu/nu) erkennbar waren, nicht bei C57BL/6 und C57BL/10.Sc.Cr auftraten.

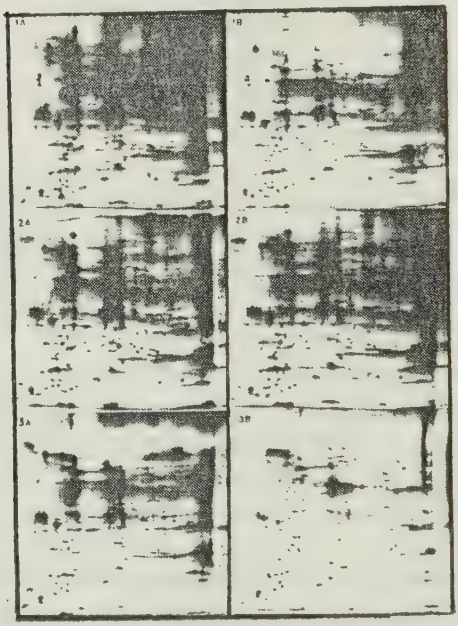

Abb. 13: Zweidimensionale Trennung von ^{35}S-Methionin-markierten Membranproteinen aus TPP- (A) und LPS-aktivierten (B) Milzlymphozyten verschiedener Mausstämme. Die Experiwurden wie in 3.2.5.8 und 3.2.7.1 beschrieben durchgeführt.
1. C57BL/6 2. C57BL/10.Sc.Cr 3. C57BL/6 (nu/nu)

Soweit ein Vergleich der sich entsprechenden Proteine möglich war, konnte bei den TPP- und LPS-aktivierten Milzzellen von C57BL/6-Mäusen kein signifikanter Unterschied im Membranproteinmuster entdeckt werden. Bei den LPS-aktivierten Milzzellen des LPS-Nonresponderstamms C57BL/10.Sc.Cr war auffällig, daß diese Zellen trotz der Nichtreaktivität gegenüber LPS praktisch

dasselbe Proteinmuster zeigten wie die TPP- und LPS-aktivierten Milzlymphozyten der LPS-Responderstämme C57BL/6 und C57BL/6 (nu/nu). Ein Unterschied im Muster der Membranproteine aus Milzzellen des Stamms C57BL/10.Sc.Cr nach Stimulation der Zellen mit TPP und LPS war nicht erkennbar.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Ergebnissen, daß bei den untersuchten Mausstämmen nach der Aktivierung der Milzlymphozyten durch die B-Zell-Mitogene TPP und LPS, soweit dies erkennbar ist, nahezu dieselben B-Lymphozyten-spezifischen Membranproteine exprimiert werden, unabhängig vom Signalmolekül und von der Mitogenreaktivität des Mausstamms.

4.5.5 ^{32}P-Orthophosphatmarkierung aktivierter B-Lymphozyten

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen spielen eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und Teilung von Zellen. Insbesondere nach Bindung eines Signalmoleküls an seinen spezifischen Rezeptor werden verschiedene Proteinkinasen aktiviert, die spezifisch die Membran- und cytoplasmatischen Proteine phosphorylieren, welche die zelluläre Reaktion der Zelle auf den externen Stimulus steuern. Es sollte daher untersucht werden, ob in aktivierten Milzlymphozyten durch TPP und LPS unterschiedliche Membranproteine phosphoryliert werden.
Um die membrangebundenen Phosphoproteine zu analysieren, die innerhalb der ersten Stunden nach der mitogenen Aktivierung von B-Lymphozyten exprimiert werden, wurden ruhende B-Lymphozyten von Nacktmäusen über einen Percollgradienten isoliert und 4 h mit (^{32}P)Orthophosphat in Gegenwart von TPP bzw. LPS markiert. Die Membranproteine wurden nach Bordier (102) isoliert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.

Abb. 14: Zweidimensionale Trennung ^{32}P-markierter Membranproteine von TPP-aktivierten (A) und unstimulierten (B) B-Lymphozyten aus Nacktmäusen. Die Experimente wurden nach 3.2.5.5 und 3.2.7.1 durchgeführt.

In Abb. 14 ist die zweidimensionale Trennung ^{32}P-markierter Membranproteine aus TPP-aktivierten Milzlymphozyten gezeigt. Als Kontrolle dienten unstimulierte B-Lymphozyten. Es wurden während der vierstündigen TPP-Aktivierung Proteine mit folgenden relativen Molekülmassen phosphoryliert: 78, 72, 60, 55, 46, 35, 31, 28, 17 und 15 kDa. Diese Proteine besaßen einen isoelektrischen Punkt zwischen 3,5 und 5. Daneben wurden mehrere Phosphoproteine von 55 kDa und einem pI zwischen 5 und 6 gefunden, desweiteren zwei Proteine von 70 und 55 kDa und einem pI von etwa 7. Der Vergleich mit den Membranproteinen, die im Laufe der mitogenen LPS-Aktivierung phosphoryliert wurden, ergab keinen reproduzierbaren Unterschied im Proteinmuster (Daten nicht gezeigt). Bei den unstimulierten Kontrollzellen wurden nahezu dieselben Membranproteine phosphoryliert wie nach der Aktivierung der B-Lymphozyten durch TPP oder LPS. Lediglich das 15 kDa-Protein wurde nicht exprimiert und das 60 kDa-Protein weniger stark phosphoryliert. Dieser Befund bedeutet, daß zu Beginn der mitogenen Stimulation in B-Lymphozyten nur wenige Membranproteine spezifisch phosphoryliert werden im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

4.5.6 ^{32}P-Orthophosphatmarkierung von B-Lymphoblasten

Zur Analyse der membrangebundenen Phosphoproteine, die in aktivierten, proliferierenden Lymphozyten exprimiert werden, wurden die ruhenden B-Lymphozyten aus Milzzellen von Nacktmäusen angereichert und 40 h voraktiviert. Nach dem Abtrennen der toten Zellen wurden die vitalen Zellen weitere 4 h mit dem entsprechenden Mitogen aktiviert und dabei mit (^{32}P)Orthophosphat markiert. Die mit Triton X-114 angereicherten Membranproteine wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.

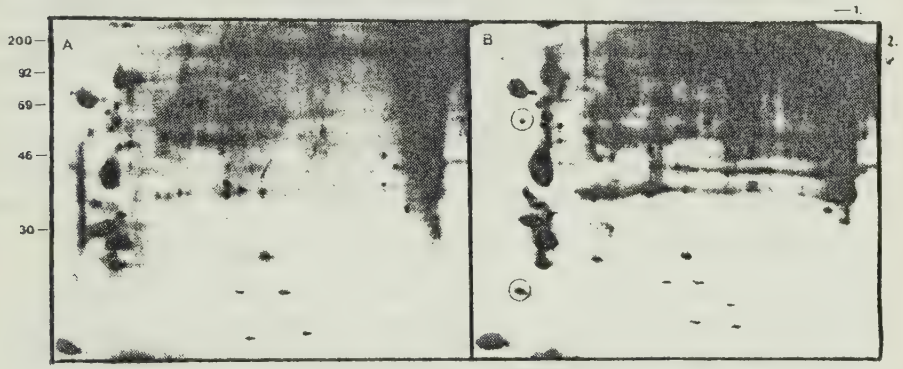

Abb. 15: Zweidimensionale Trennung ^{32}P-markierter Membranproteine von TPP- (A) und LPS-Blasten (B) aus Nacktmäusen. Die Experimente wurden wie in 3.2.5.6 und 3.2.7.1 beschrieben durchgeführt.

In Abb. 15 ist die zweidimensionale Trennung ^{32}P-markierter Membranproteine aus TPP- und LPS-aktivierten B-Lymphozyten gezeigt. Anhand der Autoradiographie konnten etwa 40 verschiedene radiomarkierte phosphorylierte Membranproteine lokalisiert werden. Von durch TPP voraktivierten und sich teilenden B-Lymphozyten wurden damit etwa dreimal soviel Proteine phosphoryliert wie von den kurzzeitig stimulierten Zellen. Ein Vergleich des Phosphoproteinmusters dieser beiden Zellpopulationen ergab, daß die 4 h nach Zugabe des Mitogens phosphorylierten Membranproteine auch von den proliferierenden Lymphozyten exprimiert wurden. Zusätzlich traten im Laufe der Zellteilung etwa 25 neue Phosphoproteine auf. Zu diesen Proteinen gehörten die schweren

Ketten der MHC-Antigene der Klasse I (46 kDa), nicht jedoch die der Klasse II. Die durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennten Phosphoproteine von sich teilenden B-Lymphozyten, die durch LPS aktiviert worden waren, zeigten ein vergleichbares Proteinmuster wie TPP-stimulierte Zellen. In drei unabhängig voneinander durchgeführten Exprimenten konnten jedoch nach LPS-Stimulation zwei Phosphoproteine nachgewiesen werden, die von B-Lymphozyten nach TPP-Stimulation nicht exprimiert wurden: Ein Protein besaß eine relative Molekülmasse von 60-63 kDa, das andere von 17 kDa. Bei beiden Proteinen handelte es sich um saure Phosphoproteine mit einem pI-Wert zwischen 3 und 4. Weitere Unterschiede im Phosphoproteinmuster waren allerdings nicht reproduzierbar.
Dieser Befund bedeutet, daß die Wirkung der beiden B-Zell-Mitogene TPP und LPS auf proliferierende B-Lymphozyten nicht identisch ist, sondern zu einer unterschiedlichen Phosphorylierung von mindestens zwei Membranproteinen führt.

4.5.7 ^{32}P-Orthophosphatmarkierung aktivierter Milzzellen aus verschiedenen Mausstämmen

In diesem Experiment sollten die Phosphoproteinmuster von mitogenaktivierten und sich teilenden Milzzellen eines LPS-Nonresponder- und zweier LPS-Responderstämme, von denen einer keine reifen T-Lymphozyten besitzt, miteinander verglichen werden. Die Milzzellen wurden 40 h voraktiviert und anschließend mit (^{32}P)Orthophosphat markiert.

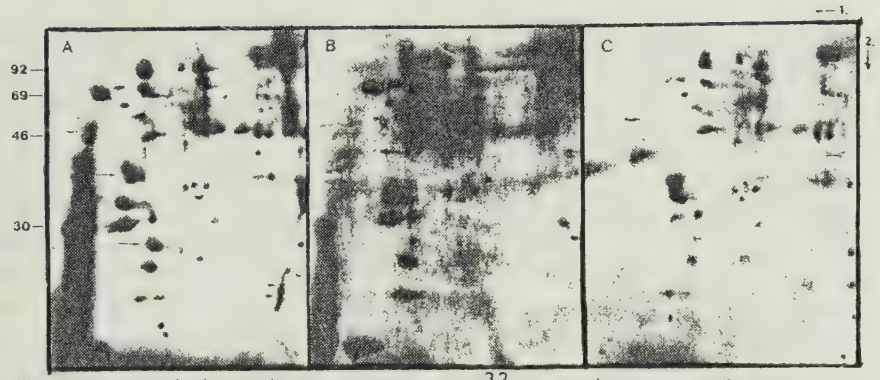

Abb. 16: Zweidimensionale Trennung ^{32}P-markierter Membranproteine aus Milzlymphozyten verschiedener Mausstämme nach TPP-Stimulation (Ausschnitt). Die Experimente wurden nach 3.2.5.6 und 3.2.7.1 durchgeführt.
1. C57BL/6 (nu/nu) 2. C57BL/6 3. C57BL/10.Sc.Cr

In Abb. 16 ist die zweidimensionale Trennung ^{32}P-markierter Membranproteine aus mitogenaktivierten, proliferierenden Milzlymphozyten eines LPS-Nonresponder- und zweier LPS-Responderstämme gezeigt. Ein Vergleich des Phosphoproteinmusters der beiden LPS-Responderstämme C57BL/6 und C57BL/6 (nu/nu) zeigte, daß von C57BL/6-Milzlymphozyten nach der mitogenen Aktivierung mit TPP oder LPS keine zusätzlichen Phosphoproteine exprimiert werden, obwohl dieser Mausstamm funktionsfähige T-Lymphozyten besitzt. Dies ist wiederum ein starker Hinweis dafür, daß durch diese bakteriellen Zellwandbestandteile bzw. deren synthetische Analoga nur B-Lymphozyten polyklonal aktiviert werden, bei denen dann im Laufe der Aktivierung spezifisch Membranproteine phosphoryliert werden. Bei den Milzlymphozyten aus C57BL/6 nu/nu-Mäusen wurden nach TPP-Stimulation 4 Phosphoproteine identifiziert, die bei den entsprechend aktivierten Zellen aus C57BL/6-Mäusen nicht gefunden wurden, und zwar mit einer relativen Molekülmasse zwischen 38 kDa und 42 kDa und einem isoelektrischen Punkt unter 4, desweiteren ein saures Protein von 29 kDa (siehe Markierung). Dieses Ergebnis wurde auch bei den LPS-stimulierten Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde das Phosphoproteinmuster von mitogenaktivierten Milzzellen des LPS-Nonresponderstamms C57BL/10.Sc.Cr mit dem der entsprechend aktivierten Zellen aus dem verwandten LPS-Responderstamm C57BL/6 (nu/nu) verglichen. Nach der Stimulation der Milzzellen mit TPP wurden bei beiden Mausstämmen dieselben Membranproteine phosphoryliert, was wiederum für die B-Zell-Spezifität der synthetischen Lipopeptide spricht. Völlig anders sah das Proteinmuster der phosphorylierten Membranproteine LPS-aktivierter Milzzellen von C57BL/10.Sc.Cr aus. Statt der etwa 40 Phosphoproteine, die bei LPS-aktivierten Milzzellen aus C57BL/6 nu/nu-Mäusen gefunden wurden, konnten hier nur etwa 15 bis 20 lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt).
Dieser Befund bedeutet, daß während der durch ein Signalmolekül wie TPP oder LPS ausgelösten Lymphozytenaktivierung und der sich anschließenden Teilung der Zellen spezifisch Membranproteine phosphoryliert werden, die möglicherweise bei der Weiterleitung des Aktivierungssignals beteiligt sind.

4.5.8 Markierung von B-Lymphoblasten mit (^{35}S)Sulfat

Die Sulfatidierung von Proteinen ist bisher wenig untersucht worden. Ob diese posttranslationelle Modifikation, die auch bei Membranproteinen gefunden wurde, bei der Weiterleitung des Aktivierungssignals irgendeine Rolle spielt, ist völlig unbekannt. Es sollte daher untersucht werden, ob von mitogenaktivierten, proliferierenden B-Lymphozyten $^{35}SO_4$-markierte Membranproteine exprimiert werden. Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob durch die beiden Signalmoleküle TPP und LPS unterschiedliche Proteine induziert werden.
Die ruhenden B-Lymphozyten aus Nacktmäusen wurden über einen Percolldichtegradienten angereichert und 40 h mitogenaktiviert. Nach dem Abtrennen der toten Lymphozyten wurden die Zellen, vorwiegend B-Lymphoblasten, 4 h mit (^{35}S)Sulfat in Gegenwart des jeweiligen Mitogens markiert. Die Membranproteine wurden nach der Bordiermethode (102) isoliert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.

Der Einbau von (^{35}S)Sulfat in die Membranfraktion lag, wie in 4.4.7 gezeigt, bei etwa 6000 cpm/1 x 10^6 eingesetzter Zellen. Bei einer Expositionsdauer von 5 Wochen konnten sowohl bei den TPP- als auch bei den LPS-aktivierten Zellen zwei Membranproteine identifiziert werden, die allerdings äußerst schwach markiert waren. Diese Proteine besaßen eine relative Molekülmasse von 55 kDa und 42 kDa und einen isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 und 4,5 (Abb. 17).

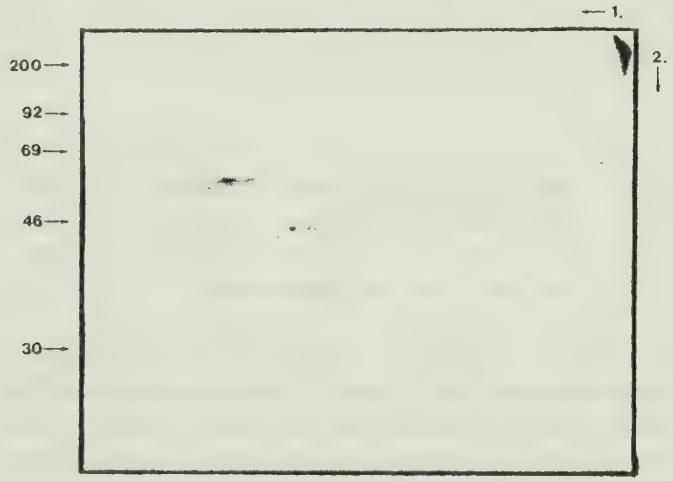

Abb. 17: Zweidimensionale Trennung ^{35}S-Sulfat-markierter Membranproteine aus TPP-aktivierten Milzlymphozyten von Nacktmäusen. Die Experimente wurden nach 3.2.5.9 und 3.2.7.1 durchgeführt.

4.5.9 Markierung von mitogenaktivierten Milzzellen aus verschiedenen Mausstämmen mit (^{35}S)Sulfat

Es sollte der Einfluß von TPP und LPS auf die Sulfatidierung von Membranproteinen aktivierter, proliferierender Milzlymphozyten aus einem LPS-Nonresponder- und zwei damit verwandten LPS-Responderstämmen untersucht werden.

Die Membranproteine wurden mit Hilfe von Triton X-114 angereichert. Der Einbau von (^{35}S)Sulfat in die Membranfraktion betrug, wie in 4.4.8 gezeigt, etwa 13 000 cpm/10^6 Zellen. Nach der Trennung der Proteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese wurden die Gele 9 Wochen bei -70°C exponiert. Trotz dieser langen Expositionsdauer war eine Identifizierung markierter Proteine anhand der Fluorographien nicht möglich. Nur bei den Milzlymphozyten aus C57BL/6 nu/nu-Mäusen wurden, wenn auch sehr schwach markiert, das 55 kDa- und das 42 kDa-Protein gefunden (Daten nicht gezeigt).

4.6 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf den Phosphoinositstoffwechsel

4.6.1 Analyse der Inositphosphate

Bei der polyklonalen Aktivierung von T-Lymphozyten durch Lektine sowie bei der Aktivierung von B-Lymphozyten durch anti-IgM wird $PtdInsP_2$ zu DG und IP_3 hydrolysiert. IP_3 tritt nur vorübergehend im Cytoplasma auf und wird durch schrittweise Dephosphorylierung zu IP_2 und weiter zu IP abgebaut. Die Hydrolyse dieser Verbindung zu Inosit läßt sich in Gegenwart von LiCl spezifisch hemmen. Während das Maximum der IP_3-Bildung innerhalb weniger Minuten auf den Ausgangswert zurückgeht, steigt die IP-Konzentration im Cytoplasma in Gegenwart des Phosphatasehemmstoffs etwa 1-2 h linear an. Somit besitzt man ein empfindliches Nachweissystem, um den Einfluß externer Stimuli auf die Spaltung von $PtdInsP_2$ zu untersuchen.

Um den Einfluß von TPP auf diesen Stoffwechselweg zu untersuchen, wurden nach der spezifischen Lyse der Erythrozyten die ruhenden Milzlymphozyten von Balb/c-Mäusen über einen Percoll-Dichtegradienten angereichert und in einem inositfreien Medium 21 h mit myo-(2-^{3}H)Inosit markiert. Die Milzlymphozyten wurden in MEM resuspendiert und 1 h mit TPP aktiviert. Als Kontrollen wurden Lymphozyten mit Con A, LPS und Kaninchen-anti-Maus IgM

aktiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Chloroform/Methanol/HCl lysiert. Die wasserlöslichen Inositverbindungen wurden extrahiert und über einen Anionenaustauscher aufgetrennt.

Tab. 20: Trennung von IP, IP_2 und IP_3 über einen Dowex-1x8-400/ Formiat Anionenaustauscher. Die Experimente wurden wie in 3.2.8.4 beschrieben durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung aus einem Dreifachansatz.

	TPP	LPS	Con A	anti-IgM
	% der Kontrolle			
InsP	114 ± 7	100 ± 25	314 ± 23	144 ± 28
$InsP_2$	91 ± 13	93 ± 19	156 ± 16	175 ± 44
$InsP_3$	96 ± 29	121 ± 51	79 ± 17	251 ± 67

In Tab. 20 ist der Einfluß der verschiedenen Mitogene auf die Hydrolyse von $PtdInsP_2$ und der damit verbundenen Freisetzung von IP_3 zusammengefaßt. Nach Aktivierung von Milzzellen durch TPP wurde im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Anstieg von IP_3 oder von den dephosphorylierten Verbindungen IP_2 und IP beobachtet. Nach LPS-Stimulation wurde ebenfalls keine signifikante Konzentrationsänderung der Inositphosphate beobachtet.

Zur internen Kontrolle wurden die Milzlymphozyten mit Con A und anti-IgM stimuliert. Con A aktiviert T-Lymphozyten polyklonal, anti-IgM B-Lymphozyten. Von beiden Mitogenen ist bereits bekannt, daß sie die Hydrolyse von $PtdInsP_2$ induzieren. Wie aus Tab. 20 ersichtlich ist, konnte dieser Befund bestätigt werden.

4.6.2 Analyse der inosithaltigen Phospholipide

Die Phospholipide der mitogenaktivierten Milzlymphozyten wurden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie analysiert. In der ersten Dimension wurden sie mit einem alkalischen, in der zweiten Dimension in einem sauren Laufmittel aufgetrennt. Die einzelnen Lipidflecken wurden mit Joddampf angefärbt und konnten zum Teil durch Vergleich mit Phospholipidstandards und aufgrund ihres Laufverhaltens identifiziert werden. Zur Bestimmung der in die inosithaltigen Lipide eingebauten Radioaktivität wurden die markierten Lipidflecken anhand der Fluorographie lokalisiert. Die Kieselgelschicht wurde von der Platte abgetragen und in Szintillationsflüssigkeit suspendiert.

In Abb. 18 ist die zweidimensionale dünnschichtchromatographische Trennung der myo-(2-^{3}H) Inosit-haltigen Lipide gezeigt. Anhand der Fluorographie konnten sechs intensive Lipidflecken nachgewiesen werden, die in allen Experimenten auftraten. Am stärksten markiert waren PtdIns, PtdInsP und PtdInsP$_2$. Daneben waren eine Reihe schwach ausgeprägter Lipidflecken sichtbar, die wahrscheinlich auf eine nicht vollständige Trennung der Lipide in der 2. Dimension infolge alkalischer Laufmittelrückstände zurückzuführen sind. Einige der stärker markierten Lipide konnten nicht identifiziert werden. Möglicherweise handelte es sich um deacylierte Verbindungen, die während der Lipidisolierung gebildet wurden.

Abb. 18: Zweidimensionale dunnschichtchromatographische Trennung der inosithaltigen Lipide. Die Lipide wurden in der 1. Dimension mit Chloroform/Methanol/25% Ammoniak/Wasser (90:74:13:8) und nach dem Trocknen der DC-Platte in der 2. Dimension mit Chloroform/Methanol/Essigsaure/Wasser (98:13:50:10) getrennt. Radioaktive Lipide wurden fluorographisch lokalisiert.

( ) intensiv markierte Lipidflecken

( ) schwach markierte Lipidflecken

Tab. 21: Bestimmung der in die inosithaltigen Lipide eingebauten Radioaktivität. Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment.

Fleck Nr.	Lipid	Kontrolle	TPP	LPS	ConA
		% der Gesamtradioaktivität			
1	PtIns	88	82	80	81
2	PtInsP	3	2	4	3
3	$PtInsP_2$	6	11	6	8
sonstige		3	5	11	9

In Tab. 21 ist der Einbau von myo-(2-^{3}H)Inosit in die Lipide zusammengefaßt, die anhand des Fluorogramms lokalisiert werden konnten. Die Hauptmenge des radioaktiven Inosits wurde sowohl bei den Kontroll- als auch bei den mitogenaktivierten Zellen im PtdIns gefunden, wobei der Anteil an der gesamten aufgetragenen Radioaktivitätsmenge bei den aktivierten Zellen bei etwa 80%, bei der negativen Kontrolle dagegen 88% betrug. Der Prozentsatz des markierten PtdInsP lag in allen Kulturen bei etwa 3%. In $PtdInsP_2$ wurden bei LPS- und Con A-stimulierten Zellen zwischen 6% und 8% der Gesamtradioaktivität eingebaut. Lediglich bei TPP-stimulierten Zellen lag dieser Wert bei etwa 11%. Aufgrund der erheblichen Schwankungen im Prozentsatz der nicht identifizierten Lipide zwischen den verschiedenen Kulturen erscheint diese Erhöhung jedoch nicht signifikant.

4.7 Synthese der Affinitätssäule

4.7.1 Kopplung von Tripalmitoylpentapeptid an Glaspartikel

Bindeproteine im Mausserum und von Milzlymphozyten für den synthetischen N-Terminus von Lipoprotein, TPP, sollten durch Affinitätschromatographie angereichert werden. Hierzu wurde das Lipopeptid über die endständige Carboxylgruppe an Aminopropyl-derivatisierte Glaspartikel gekoppelt. Um bei der Synthese unerwünschte Nebenreaktionen gering zu halten, wurde TPP mit Carbodiimid und 1-Hydroxybenzotriazol in einen Aktivester überführt, dessen Aminolyse durch die Aminopropylgruppe zu einer kovalenten Bindung mit dem Trägermaterial führte.

Die Aminosäureanalyse ergab, daß an 400 mg Glaspartikel (entsprechend 0,072 mmol NH_2-Gruppen) 47,6 mg TPP gekoppelt waren. Dies entsprach 0,936 µmol TPP/10 mg Gel (Tab. 22).

Tab. 22: Quantitative Auswertung der Aminosäureanalyse

eingesetztes TPP	gekoppeltes TPP	besetzte NH_2-Guppen 72 µMol = 100%
74 µmol	37,44 µmol	52%

Weiterhin zeigte sich, daß wahrend der Kopplung an das Affinitätsharz das Lipopeptid nicht hydrolysiert wurde (Tab. 23).

Tab. 23: Aminosäureanalyse von CPG-TPP

Aminosäure	gefundener Wert	theoretischer Wert
Alanin*	1,00	1,0
Cystein	0,77	1,0
Asparaginsäure	1,14	1,0
Serin	1,94	2,0

* Die Alaninkonzentration wurde gleich 1,0 gesetzt und damit die Zahl der übrigen Aminosäuren bestimmt.

4.7.2 Acetylierung der Aminopropylgruppen

Durch Acetylierung wurden die am Trägermaterial verbliebenen Aminopropylgruppen blockiert, damit sie nicht als Ionenaustauscher wirken und eine spezifische Proteinbindung vortäuschen konnten.

Als Acetylierungsreagens sollte Essigsäure-4-nitro-phenylester verwendet werden, der selektiv mit Aminogruppen reagiert, nicht jedoch mit der Hydroxylgruppe des Serins im Tripalmitoylpentapeptidmolekül. Die Reaktion erfolgte trotz entsprechend langer Reaktionszeiten (20 h) und eines zwanzigfachen Überschusses des Acetylierungsreagens weder bei Raumtemperatur noch bei 60°C quantitativ, wie der colorimetrische Farbtest mit Kaiser's Reagens ergab (Daten nicht gezeigt). Durch Zusatz von N-Methylmorpholin oder von Triethylamin zur Neutralisierung des freiwerdenden 4-Nitrophenols konnte die Acetylierungsausbeute nicht gesteigert werden.

Deshalb wurden die freien Aminopropylgruppen mit Acetanhydrid derivatisiert, obwohl dieses Acetylierungsreagens nicht ausschließlich mit Aminogruppen reagiert, sondern auch mit Hydroxylgruppen. In einem Parallelansatz wurde in Chloroform gelöstes Lipopeptid unter den gleichen Bedingungen wie das an die Glaspartikel gekoppelte TPP mit Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionsprodukte wurden dünnschichtchromatographisch analysiert

(siehe Abb. 19). Als positive Kontrolle diente TPP, daß 1 h bei 60°C unter Zusatz von N-Methylmorpholin acetyliert worden war. Die Auswertung ergab, daß eine Reaktionsdauer von 1,75 h und eine Reaktionstemperatur von 65°C zu keiner nennenswerten Acetylierung des Lipopeptids führten (siehe unten). Der colorimetrische Farbtest mit Kaiser's Reagens zeigte eine sehr schwache Blaufärbung der Glaspartikel und eine grün-gelbliche Färbung der Lösung. Dieses Ergebnis bedeutet, daß mehr als 96% der Aminopropylgruppen mit Acetanhydrid derivatisiert worden sind.

Zur Bestimmung der unspezifischen Proteinadsorption an das Säulenmaterial wurde ein Affinitätsharz synthetisiert (CPG-NHAc), das kein kovalent gebundenes Lipopeptid enthielt. Die Aminopropylgruppen wurden mit Acetanhydrid unter den oben beschriebenen Bedingungen acetyliert. Der Farbtest mit Kaiser's Reagens ergab, daß mehr als 98% der Aminogruppen acetyliert wurden.

4.7.3 Stabilität des Affinitätsharzes

Im Anschluß an die Derivatisierung der Aminopropylgruppen wurde überprüft, ob während der Acetylierung mit Acetanhydrid eine Hydrolyse des synthetischen Lipopeptids erfolgte. Die Auswertung der Aminosäureanalyse ergab, daß die Bindung von TPP an das Affinitätsharz stabil war. Außerdem zeigten die wiederholt durchgeführten Aminosäureanalysen nach der affinitätschromatographischen Anreicherung von Lipopeptid-Bindeproteinen, daß unter den experimentellen Bedingungen keine Abspaltung des Liganden vom Säulenmaterial erfolgte.

4.7.4 Acetylierung von Tripalmitoylpentapeptid

Bei der dünnschichtchromatographischen Analyse des acetylierten und des nichtmodifizierten TPP ließen sich durch Besprühen mit Wasser die hydrophoben Substanzflecken identifizieren. Neben dem Lipopeptid als Hauptkomponente waren vier weitere Verbindunge sichtbar. Der tertiäre Butylester, der während der Syn-

these des TPP als Zwischenprodukt auftritt, war als geringe Verunreinigung sowohl in der Vergleichssubstanz als auch in der acetylierten Präparation nachweisbar. Daneben traten in dieser Präparation zwei neue, intensive Substanzflecken auf, die in der Kontrolle fehlten. Beide Verbindungen konnten durch Chlor/4,4'-Bis(dimethylamino)diphenylmethan angefärbt werden. Der R_f-Wert dieser Substanzen war größer (0,41 und 0,38) als der des unmodifizierten TPP (0,21). Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich um Lipopeptide, bei denen eine oder beide Hydroxylgruppen des Serins acetyliert waren. Mono- und diacetyliertes TPP sollten nämlich hydrophober sein als die unmodifizierte Verbindung. Aufgrund sterischer Hinderung erfolgte die Acetylierung der Ausgangsverbindung innerhalb von 1 h bei 60°C unter Zusatz von N-Methylmorpholin nicht vollständig, während bei einer Reaktionsdauer von 1,75 h und einer Reaktionstemperatur von 65°C in Abwesenheit von N-Methylmorpholin keine acetylierten Lipopeptide nachgewiesen werden konnten.

Zusätzlich waren vier weitere Substanzflecken sichtbar, die sowohl in der negativen (TPP) wie auch in der positiven Kontrolle (acetyliertes TPP) auftraten, während zwei davon in der nicht acetylierten Probe fehlten. Bei diesen Verbindungen, die mit Ausnahme des Dicyclohexylharnstoffs nicht identifiziert werden konnten, handelte es sich vermutlich um Zwischenprodukte, die bei der TPP-Synthese gebildet wurden.

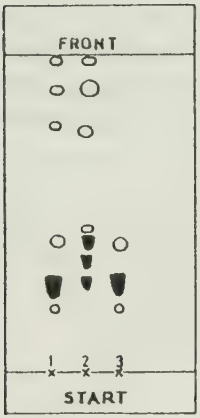

Abb. 19: Dünnschichtchromatographische Analyse von TPP (1), acetyliertem TPP (2) (1 h, 60°C, mit Acetanhydrid, Zusatz von N-Methylmorpholin) und TPP, das 1,75 h bei 65°C mit Acetanhydrid versetzt wurde (3). Die Reaktionsprodukte wurden in Chloroform/ Methanol/ Wasser (65:25:4) aufgetrennt. Die verschiedenen Substanzflecken wurden erst durch Besprühen der DC-Platte mit Wasser und danach mit Chlor/4,4'-Bis(dimethylamino)-diphenylmethan sichtbar gemacht.

4.8 Bindeproteine im Serum für Tripalmitoylpentapeptid

4.8.1 Trennung der Serumproteine an einer Lipopeptid-Affinitätssäule

Lipoprotein aus der äußeren Membran von Escherichia coli und einige synthetische N-terminale Teilsequenzen sind in vitro

hochaktive polyklonale Aktivatoren für B-Lymphozyten. Intravenöse Applikation bei Testtieren führt nach Interaktion mit den humoralen und zellulären Bestandteilen des Blutes zu einer Hypertrophie der Milz und zur Aktivierung der B-Zellen in vivo. Durch Affinitätschromatographie sollten Bindeproteine im Mausserum für das synthetische Lipopeptid TPP angereichert werden. Hierzu wurde das Mitogen nach der Carbodiimidmethode an Aminopropyl-derivatisierte Glaspartikel gekoppelt (siehe 3.2.9.1). Das Mausserum wurde auf die Affinitätssäule aufgetragen, und die nicht gebundenen Proteine wurden durch Waschen mit Äquilibrierungspuffer entfernt. Die am Affinitätsgel gebundenen Proteine wurden mit 4% SDS eluiert. In Abb. 20 ist das Elutionsprofil einer Trennung gezeigt.

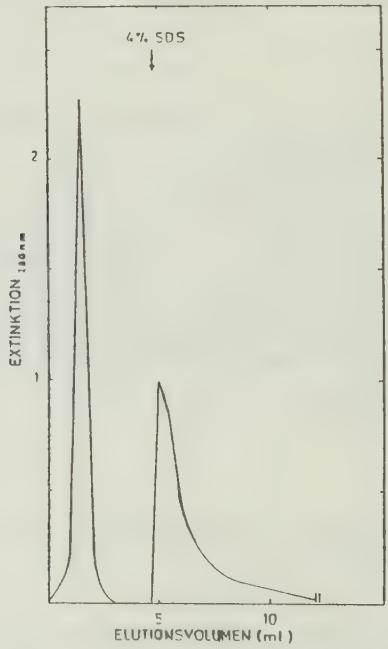

Abb. 20: Elutionsprofil der über eine CPG-TPP-Affinitätssäule aufgetrennten Mausserumproteine (Balb/c). Säulenauftrag: 0,07 ml Mausserum Fraktionsvolumen: 0,5 ml.

4.8.2 Relative Molekülmassen der an CPG-TPP adsorbierten Proteine

Die in den nicht bindenden und bindenden Fraktionen enthaltenen Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärbung mit Coomassie Blau konnten in der am Lipopeptidharz angereicherten Fraktion mehrere Proteinbanden sichtbar gemacht werden (Abb. 21).

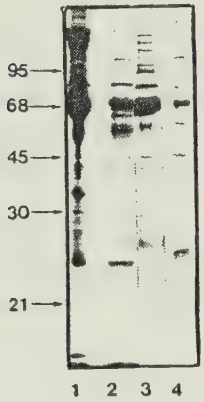

Abb. 21: Elektropherogramm von Mausserumproteinen (Balb/c). Trennung an einer CPG-TPP- bzw. CPG-NHAc-Säule. Elution der gebundenen Serumproteine mit 4% SDS.

1 Nicht bindende Proteine (CPG-TPP)
2 SDS-eluierte Proteine (CPG-TPP)
3 Nicht bindende Proteine (CPG-NHAc)
4 SDS-eluierte Proteine (CPG-NHAc)

Nach Elution der gebundenen Proteine von der CPG-TPP-Säule und gelelektrophoretischer Trennung wurden zahlreiche Proteine gefunden. Das am intensivsten angefärbte Protein besaß eine relative Molekülmasse von 67 kDa und wurde als Albumin identifiziert. Es konnte über eine Affi-Gel-Blue-Affinitätssäule, die

unter bestimmten Bedingungen nur Albumin bindet, abgetrennt werden (Daten nicht gezeigt). Daneben wurden einige schwach gefärbte Banden gefunden mit relativen Molekülmassen von 23, 46, 56, 58, 64, 80, 100, 120 und 140 kDa (Abb. 21, Spur 2)

4.8.3 Bestimmung der unspezifischen Proteinadsorption

Serum von Balb/c-Mäusen wurde auf eine Säule mit acetylierten Aminopropylgruppen (CPG-NHAc) aufgetragen, die kein kovalent gebundenes Lipopeptid enthielt. Damit sollten die Proteine untersucht werden, die aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen wie Wasserstoff-Brückenbindungen, ionischer sowie hydrophober Bindungen an das derivatisierte CPG-Gelmaterial adsorbieren.

In Abb. 22 ist das Elutionsprofil der Trennung gezeigt. An die acetylierten CPG-NH_2-Partikel wurden etwa 10% der aufgetragenen Serumproteine gebunden. Diese konnten mit 4% SDS eluiert werden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung ergab sich in der mit 4% SDS eluierten Hauptfraktion folgendes Bandenmuster: 23, 43, 46, 64, 80, 100, 120, 140 und 180 kDa. Am intensivsten gefärbt war ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von 67 kDa, nämlich Albumin (siehe Abb. 21, Spur 4).

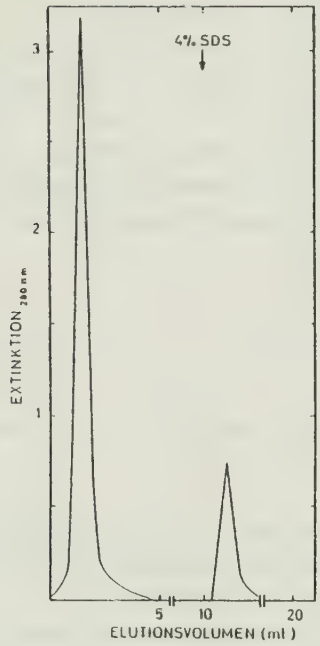

Abb. 22: Elutionsprofil der Trennung von Mausserumproteinen (Balb/c) an einer CPG-NHAc-Affinitätssäule. Säulenauftrag: 0,07 ml Mausserum. Fraktionsvolumen: 0,5 ml

4.8.4 Vergleich der an CPG-TPP und CPG-NHAc adsorbierten Proteine

Unter den an CPG-TPP und CPG-NHAc adsorbierten Proteinen, die mit 4% SDS eluiert werden konnten, traten nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit Coomassie Blau eine Reihe von schwachen Proteinbanden auf, die ähnliche relative Molekülmassen besaßen: 23, 43, 46, 56, 80, 100, 120 und 140 kDa. Am

intensivsten gefärbt war ein 67 kDa-Protein, nämlich Albumin. Allerdings wurde dieses Protein durch das CPG-TPP-Affinitätsharz wesentlich effektiver angereichert als durch die Kontrollsäule, die aufgrund der acetylierten Aminogruppen ebenfalls schwach hydrophobe Eigenschafen besitzt und dadurch Albumin binden kann. Dieser Befund deutet darauf hin, daß Albumin das Hauptbindeprotein für synthetische Lipopeptide im Serum ist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß weitere Serumproteine am Transport dieser Mitogene zu den lymphatischen Organen beteiligt sind.

4.9 Lymphozytenbindeproteine für synthetische Lipopeptide

4.9.1 Affinitätschromatographische Trennung ^{3}H-Leucin-markierter Proteine Lipopeptid-stimulierter Milzzellen

Das an Aminopropyl-CPG gekoppelte synthetische B-Zell-Mitogen TPP (CPG-TPP) wurde eingesetzt, um Bindeproteine für den biologisch aktiven Teil des bakteriellen Lipoproteins anzureichern. Der nicht an das Affinitätsharz gebundene Anteil des ^{3}H-Leucin-markierten Gesamtlysats von TPP-stimulierten Milzzellen (siehe 3.2.5.5) wurde wie in 3.2.9.3 beschrieben von der Säule gewaschen. Danach wurden die adsorbierten Proteine spezifisch mit $2{,}36 \times 10^{-4}$ M (0,3 mg/ml) TPP eluiert.

Es zeigte sich, daß etwa 15% des aufgetragenen markierten Zellsolubilisats nicht an die Säule gebunden wurden. Durch selektive Elution mit dem synthetischen Lipopeptid konnten etwa 38% der eingesetzten Radioaktivitätsmenge freigesetzt werden. Alle übrigen adsorbierten Proteine ließen sich mit 4% SDS von der Affinitätssäule eluieren (Abb. 23).

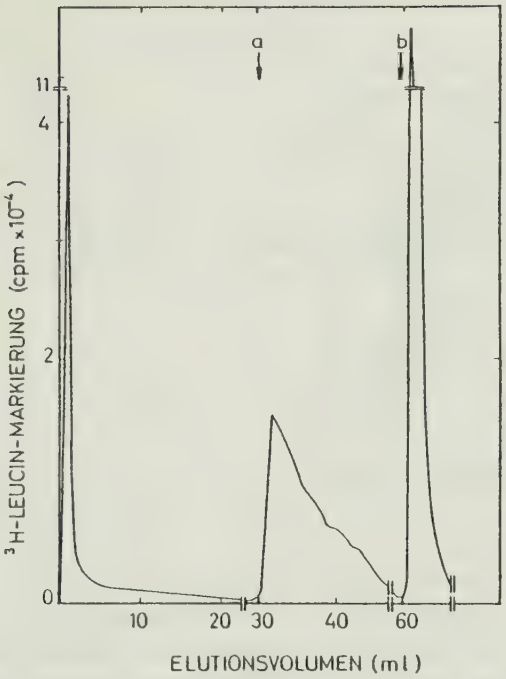

Abb. 23: Elutionsprofil der Trennung ^{3}H-Leucin-markierter Zellproteine von Balb/c-Milzzellen an einer CPG-TPP-Säule. Milzzellen wurden 48 h mit 2,5 µg/ml TPP aktiviert, davon die letzten 24 h in Gegenwart von (^{3}H)Leucin. Die Zellen wurden mit 0,5% Nonidet P40 solubilisiert. Fraktionsvolumen: 0,32 ml; cpm/20 µl.
a 0,3 mg/ml TPP b 4 mg/ml SDS

4.9.2 Relative Molekülmassen der affinitätschromatographisch angereicherten Lipopeptid-Bindeproteine

Die spezifisch mit TPP eluierten, ^{3}H-Leucin-markierten Zellproteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgradientengel aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert.

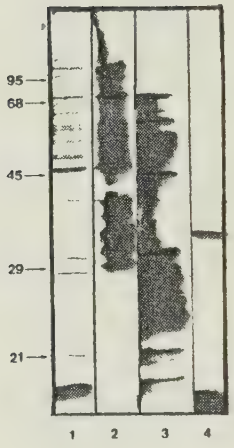

Abb. 24: Elektropherogramm und Autoradiogramme ^{3}H-markierter Proteine von Balb/c-Milzzellen. Trennung der Milzzellproteine an einer CPG-TPP-Säule. Säulenauftrag: Nonidet P40 Solubilisat, spezifische Elution mit 0,3 mg/ml TPP; SDS-Gradientengel mit 10%-20% Acrylamid, exponentiell.

1 Elektropherogramm des Nonidet P40 Zellsolubilisats
2 Nonidet P40 Solubilisat (Expositionsdauer 21 h)
3 Nicht bindende Proteine (Expositionsdauer 2 Tage)
4 TPP-Fraktion (Expositionsdauer 4 Tage)

In der spezifisch mit TPP eluierten Hauptfraktion ließ sich anhand der Fluorographie eine Proteinbande identifizieren, die im Vergleich zu den nicht an das Affinitätsharz bindenden Proteinen sehr stark angereichert war (Abb. 24). Dieses Protein besaß eine relative Molekülmasse von 35 kDa. Durch Verwendung eines 10%-18%igen Gradientengels stellte sich heraus, daß es sich dabei um eine Doppelbande von 35 kDa und 33 kDa handelte (Daten nicht gezeigt).

Daneben waren nach längerer Expositionsdauer (10-14 Tage) einige schwache Banden detektierbar, die jedoch nicht in allen Experimenten auftraten. Diese Proteine besaßen relative Molekülmassen von 70, 31, 23, 21, 17 und 14 kDa (Daten nicht gezeigt). Es handelte sich im wesentliche um Proteinbanden, die auch in der nicht bindenden Fraktion auftraten und dort stark angereichert waren. Weiterhin war an der Gelfront eine intensive Bande mit niedermolekularen Peptiden sichtbar, die allerdings nicht identifiziert werden konnten.

4.9.3 Charakterisierung der Lipopeptid-Bindeproteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese

Aus Lipopeptid-aktivierten Lymphozyten konnte nach affinitätschromatographischer Auftrennung der Proteine an einem Lipopeptid-Harz in der selektiv mit TPP eluierten Fraktion ein 35 kDa-Hauptbindeprotein angereichert werden. Daneben trat ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von 33 kDa auf. Beide Proteine wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese weiter charakterisiert: In einem engen zylindrischen Gel wurden die Proteine in Abhängigkeit vom isoelektrischen Punkt aufgetrennt, und in der zweiten Dimension erfolgte eine Auftrennung nach der relativen Molekülmasse. Nach Behandlung des SDS-Polyacrylamidgels mit EN^{3}HANCE wurden die Lipopeptid-Bindeproteine durch Fluorographie detektiert.

Nach der zweidimensionalen gelelektrophoretischen Auftrennung konnten drei Lymphozytenproteine identifiziert werden, die sich durch Affinitätschromatographie an einem Lipopeptidharz und spezifischer Elution mit TPP anreichern ließen. Das Hauptprotein besaß eine relative Molekülmasse von 35 kDa; dieser Wert wurde ebenfalls bei der Molekülmassenbestimmung im SDS-Gradientengel gefunden. Anhand einer pH-Eichkurve zeigte sich, daß es sich um ein saures Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 4,0 $\pm$ 0,5 handelte. Die beiden anderen, weniger stark ausgeprägten Proteine besaßen relative Molekülmassen von 33 kDa und

32 kDa; ihre isoelektrischen Punkte stimmten mit dem des Hauptproteins praktisch überein (Abb. 25).

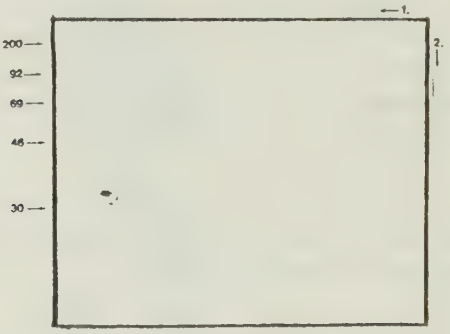

Abb. 25: Analyse der Lipopeptid-Bindeproteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese. Die am CPG-TPP-Harz adsorbierten und mit TPP eluierten ^{3}H-Leucin-markierten Proteine Lipopeptid-aktivierter Milzzellen (Balb/c) wurden in der 1. Dimension nach ihrem pI-Wert und in der 2. Dimension nach ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt.

5. DISKUSSION

5.1 Lymphozytenaktivierung durch synthetische Lipopeptide

In dieser Arbeit sollten mögliche molekulare Mechanismen untersucht werden, durch die sich mitogenreaktive B-Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung stimulieren lassen. Als Effektorsubstanzen wurden bakterielle Zellwandbestandteile und deren synthetische Analoga verwendet. Die genauere Analyse der Aktivierung von B-Lymphozyten durch synthetische Lipopeptide konzentrierte sich auf die Wechselwirkung dieses polyklonalen Aktivators mit Membranproteinen und auf die Identifizierung von Lipopeptid-Bindeproteinen.

Lipoprotein aus der Zellwand gramnegativer Bakterien wirkt gegenüber Milzlymphozyten verschiedener Spezies *in vivo* und *in vitro* als polyklonaler Aktivator. Intravenöse Applikation bei Testtieren führt zu einer Hypertrophie der Milz und zu einer Aktivierung der Zellen *in vivo* (14). *In vitro* läßt sich die mitogeninduzierte Proliferation der Milzlymphozyten durch einen erhöhten Einbau von (^{3}H)Thymidin in die Milzzell-DNA nachweisen. Mit Hilfe eines hämolytischen Plaquetests konnte weiterhin gezeigt werden, daß Lipoprotein eine Differenzierung der B-Lymphozyten zu antikörpersezernierenden Plasmazellen induziert (20). Durch Verwendung von Milzzellen aus LPS-nichtreaktiven Mausstämmen wurde sichergestellt, daß die polyklonale Aktivierung ausschließlich durch das Lipoprotein und nicht durch eine LPS-Kontamination ausgelöst wird.
Die mitogene Aktivierung durch Lipoprotein ist ein T-Zell-unabhängiger Prozeß, da Milzzellen aus Nacktmäusen, die keine reifen T-Lymphozyten enthalten, aktiviert wurden (19). Dieser Befund wird unterstützt durch Grenzverdünnungsanalysen zur Bestimmung der Frequenz der reaktiven Vorläuferzellen für das synthetische Lipopeptid TPP. Die Linearität der erhaltenen Geraden zeigte, daß keine Zell-Zell-Kooperation notwendig ist, um die B-Lymphozyten zur Teilung und Differenzierung zu bringen

(119). Weiterhin konnten bei in Einzelzellkulturen gehaltenen B-Lymphozyten mit Lipoprotein sowie dem N-Terminus von Lipoprotein analogen Lipopeptiden Zellteilungen induziert werden (120). Somit gehört Lipoprotein ebenso wie LPS zu den T-Zell-unabhängigen B-Zell-Aktivatoren.

Eine direkte Wirkung auf die Proliferation von Thymozyten wurde bisher nicht beobachtet. In Zusammenarbeit mit K. Resch wurde festgestellt, daß bei B-Lymphozyten 4 h nach Zugabe von Lipoprotein oder von durch enzymatische Verdauung von Lipoprotein isolierten Lipopeptiden ein erhöhter Einbau von (^{14}C)Ölsäure und (^{14}C)Acetat in die Phosphatidylcholinfraktion der Plasmamembran erfolgte. Diese Ergebnisse wurden mit Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten gefunden, nicht dagegen mit Thymozyten, und korrelieren mit der mitogeninduzierten DNA- und RNA-Biosynthese dieser Zellen (121).

Lipoprotein aus der äußeren Membran von Escherichia coli besteht aus 58 Aminosäuren und enthält am N-terminalen S-(2,3-dihydropropyl)-cysteinrest drei Fettsäuren, von denen zwei in einer Ester-, die dritte in einer Amidbindung vorliegen. Um die Minimalstruktur zu identifizieren, die für die biologische Aktivität notwendig ist, wurde natives Lipoprotein mit Pronase enzymatisch verdaut. Es konnten lipidhaltige Fragmente isoliert werden, die zwei bis fünf Aminosäuren am S-(2,3-diacyloxypropyl)-N-acyl-cysteinrest enthielten. Diese durch enzymatische Verdauung erhaltenen Lipopeptide besaßen noch die volle biologische Aktivität (15). Inzwischen wurden einige, dem N-terminalen Teil von Lipoprotein analoge Lipopeptide synthetisiert und im biologischen Test untersucht. TPP besitzt dieselbe Aminosäurezusammensetzung wie der N-Terminus von Lipoprotein, unterscheidet sich davon aber in der Fettsäurezusammensetzung, da es nur Palmitinsäurereste enthält (18). Auch in dieser Arbeit wurde festgestellt, daß TPP in gleichem Ausmaß Milzlymphozyten zur Proliferation stimuliert wie natives Lipoprotein. Mit diesem synthetischen Lipopeptid steht somit eine Substanz zur Verfügung, die genau charakterisiert und frei von bakteriellen Kontaminationen ist und damit nicht nur für Studien in vivo und

in vitro geeignet ist, sondern auch nach Kopplung an eine unlösliche Trägersubstanz ein ausgezeichnetes Adsorbens für affinitätschromatographische Proteinisolierungen darstellt.

Um zu untersuchen, welchen Einfluß die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums auf die Mitogenität des synthetischen Lipopeptids hat, wurden Milzzellen in einem FCS-haltigen und in einem serumfreien Medium in Gegenwart von TPP kultiviert. Es zeigte sich, daß sowohl die Höhe des Stimulationsmaximums als auch das Optimum der mitogenen Aktivität bei den serumhaltigen und serumfreien Kulturen unterschiedlich war. In serumfreiem Medium proliferierten die Milzlymphozyten unter den experimentellen Bedingungen besser als in Gegenwart von fötalem Rinderserum. Offensichtlich enthält das Serum Komponenten, die einen inhibitorischen Einfluß auf die Proliferation der Lymphozyten haben. Fötales Rinderserum ist ein Gemisch sehr vieler, verschiedenartig wirkender Komponenten. Neben Wachstumsfaktoren, die für die Kultivierung von Lymphozyten *in vitro* essentiell sind, enthält Serum allerdings auch eine Reihe von Proteinen, Steroiden, Prostaglandinen und cyclischen Nukleotiden, die suppressiv auf die Induktion einer Immunantwort wirken (122). Die biologische Bedeutung dieser immunsuppressiven Faktoren ist noch unklar. Es wird diskutiert, daß sie bei der Regulation der Immunantwort eine Rolle spielen und eine permanente Proliferation der aktivierten Zellen unterdrücken.

Eine Substitution der natürlichen Sequenz Ser-Ser-Asn-Ala durch Ser-Lys-Lys-Lys sowie eine Derivatisierung dieses Lipopeptids mit Fluoresceinisothiocyanat für die Bindungsstudien führten zu keiner Verminderung der mitogenen Aktivität, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Auch eine partielle Acetylierung der Serinseitenketten im TPP-Molekül hatte keine negativen Einfluß auf die biologische Aktivität des Lipopeptids. Durch Synthese weiterer Analoga mit unterschiedlicher Aminosäure- und Fettsäurezusammensetzung (19) konnte die für die biologische Aktivität notwendige Minimalstruktur weiter eingegrenzt werden. Die mitogene Aktivität dieser Verbindungen war vorhanden, solange der S-(2,3-diacyloxypropyl)-N-acyl-cy-

steinrest noch mindestens eine weitere Aminosäure enthielt. Fehlte diese letzte Aminosäure, so kam es zu einem starken Aktivitätsverlust. Die biologische Aktivität ließ sich teilweise durch Veresterung der C-terminalen Carboxylgruppe rekonstituieren (17), desweiteren durch Kopplung von Hexamethylendiamin an die Carboxylgruppe des Cysteins (123). Somit scheint es möglich zu sein, die im nativen Lipoprotein vorhandene Aminosäuresequenz unter teilweisem Erhalt der biologischen Aktivität durch eine Reihe verschiedener Agentien zu substituieren.

Für Lipoprotein konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein einer Fettsäure für die Mitogenität notwendig ist (124), und ein ähnliches Resultat wurde mit einem synthetischen Tetrapeptid gefunden (125). Die biologische Aktivität dieser Substanzen erhöhte sich drastisch, sobald der Peptidteil an S-(2,3-diacyloxypropyl)-cystein gebunden war. Welche Bedeutung der Lipidteil dieser Mitogene für die Lymphozytenaktivierung besitzt, ist im einzelnen noch ungeklärt. Es wird diskutiert (124), daß der hydrophobe Teil mit der Plasmamembran interagiert, wodurch verschiedene Membranproteine ihre Konformation und damit ihre Exposition auf der Membranoberfläche ändern. Durch Veränderungen in der Membranfluidität wird weiterhin der Aktivitätszustand membranständiger Enzyme und Ionen-transportierender Proteine moduliert, wodurch schließlich positive Proliferationssignale ausgelöst werden könnten.

Es existieren zahlreiche Untersuchungen über den Einfluß exogener Fettsäuren auf einen mitogenen Stimulus. Während die durch PHA hervorgerufene Lymphozytenaktivierung durch (gleichzeitige) Zugabe von ungesättigten Fettsäuren gehemmt wird (126), wirken Methylester von gesättigten Fettsäuren als Comitogen (127). Da weder Palmitinsäure nach ß-Hydroxymyristinsäure, ein Bestandteil des Lipid A, mitogen sind, liegt die Vermutung nahe, daß eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen Mitogen und Zielzelle allein nicht ausreicht, um eine Zellteilung zu induzieren. Obwohl allgemein Übereinstimmung darüber besteht, daß für die polyklonalen B-Zell-Aktivatoren auf der Lymphozytenoberfläche spezifische Bindungsstellen existieren, ist es bisher nicht ge-

lungen, diese Rezeptoren eindeutig zu charakterisieren. Das Vorhandensein Lipopeptid-spezifischer Bindeproteine wird unter anderem auch deshalb postuliert, weil Diastereomere von TPP, die sich in ihrer Konfiguration am S-(2,3-diacyloxypropyl)-cysteinrest unterscheiden, unterschiedliche mitogene Aktivität besitzen (47).

5.2 Bindungsstudien mit Fluorescein-markiertem Lipopeptid

Die Frage, ob es auf der Membranoberfläche von B-Lymphozyten für die verschiedenen polyklonalen B-Zell-Aktivatoren spezifische Bindungsstellen gibt, ist bisher nicht geklärt. Es läßt sich jedoch nicht völlig ausschließen, daß Mitogene auch unspezifisch, z.B. durch hydrophobe Wechselwirkung mit Plasmamembran, an die Lymphozytenoberfläche binden. Für eine solche Theorie der unspezifischen Bindung spricht, daß es eine Vielzahl voneinander vollkommen verschiedener B-Zell-Mitogene gibt. Gemeinsam ist den meisten mitogenen Substanzen, daß sie an die Zellmembran binden und daß sie eine hohe Molekülmasse besitzen oder zumindest in Lösung hochaggregiert sind. Solche unspezifischen Mitogen-Membran-Interaktionen könnten letztlich zu Veränderungen in der Membran führen, auf die die B-Zelle mit Teilung und/oder Antikörperbildung reagiert. Für Lipoprotein konnte allerdings gezeigt werden, daß der Aggregationszustand dieses polyklonalen Aktivators nur einen geringen Einfluß auf die mitogene Aktivität besitzt (128).

Es ist schwierig, die Wechselwirkung von nativem Lipoprotein mit Lymphozytenmembranen zu untersuchen, da aufgrund der hohen Aggregationsneigung des Lipoproteins keine quantitativen Aussagen möglich sind (129). Untersuchungen von W. Scheuer mit citraconyliertem und somit löslichem ^{125}J-markiertem Lipoprotein zeigten, daß die Bindung an Milzlymphozyten reversibel, saturierbar, dosis- und zeitabhängig ist (130). In dieser Arbeit sollte die Bindung eines FITC-markierten Lipopeptids an verschiedene Leukozyten und die entsprechenden Tumorzellen unter-

sucht werden. Damit sollte die Frage geklärt werden, ob synthetische Lipopeptide aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften an jeden Zelltyp binden oder selektiv an die reaktiven Zellen. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich das markierte Lipopeptid nach der Bindung an die Zelle auf der Zelloberfläche verteilt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß FITC-markiertes Lipopeptid nicht nur an mitogenreaktive Zellen bindet, sondern wahrscheinlich aufgrund seiner hydrophoben Lipidstruktur auch an solche Zellen, bei denen nach Zusatz von synthetischen Lipopeptiden kein biologischer Effekt beobachtet werden konnte. Dazu gehören Thymus-, T-Lymphom- und Mastocytomzellen, aber auch Erythrozyten und acetonbehandelte Salmonella thyphimurium-Zellen (131). Die Frage, ob neben einer unspezifischen Interaktion mit Membranproteinen und -lipiden eine Bindung an spezifische Oberflächenstrukturen existiert, konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden und Mitteln nicht eindeutig geklärt werden. Durch Vorinkubation der Zellen mit einem zwanzigfachen Überschuß des synthetischen Lipopeptids TPP wurde versucht, den Einfluß der unspezifischen Bindung an die Zelloberfläche zu reduzieren. Unter den experimentellen Bedingungen war es nicht möglich, die Bindung des FITC-Lipopeptids vollständig oder zumindest teilweise zu inhibieren. Wahrscheinlich erfolgte eine intermolekulare Interaktion zwischen dem markierten und unmarkierten Lipopeptid. Für LPS wurde ein Effekt beschrieben ("pilling up"), bei dem membrangebundenes LPS mit freiem LPS wechselwirkte, was eine Verfälschung von Bindungsdaten zur Folge hatte (43).

Um die Fluoreszenzintensität bei den Zellen, an die das FITC-Lipopeptid gebunden war, quantitativ zu bestimmunge, wurden diese Zellen mit Hilfe eines FACS analysiert. In vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß zwischen der Bindung von Lipopeptiden an Tumorzellen und an die entsprechenden Primärzellen kein Unterschied besteht. Daher wurden die FACS-Analysen mit Tumorzellen durchgeführt, die im Gegensatz zu Milzzellen eine homogenere Population darstellen.

Es zeigte sich, daß die Bindung des FITC-Lipopeptids an die verwendeten Tumorzellen nicht sättigbar war. Dieser Befund steht in Gegensatz zu Bindungsstudien mit ^{125}J-markiertem citraconyliertem Lipoprotein, dessen Bindung an Milzzellen saturierbar war (130). Offensichtlich interagiert das synthetische Lipopeptid trotz seiner relativ guten Löslichkeit stärker mit der Zelloberfläche als das modifizierte Lipoprotein. Wahrscheinlich verstärkt sich die hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem FITC- Lipopeptid und den verschiedenen Membrankomponenten aufgrund der aromatischen Fluoresceingruppe. Dieser Effekt wurde auch bei gegen Oberflächenproteine gerichtete FITC-markierten Antikörpern beschrieben, die nach der Derivatisierung unspezifisch von Zellen gebunden wurden, denen das Antigen fehlte. Hinzu kommt, daß der Fluoreszenzfarbstoff und das Lipopeptid ähnlich groß sind und sich infolge der geringen Größe des Lipopeptids gegenseitig beeinflussen können. Weiterhin besitzt die synthetische Verbindung mindestens eine positive Ladung aufgrund der nicht vollständigen Reaktion aller Lysinreste mit Fluoresceinisothiocyanat, wodurch es zu einer ionischen Wechselwirkung zwischen dem Lipopeptid und negativ geladenen Glykoproteinen kommen kann.

Während die FACS-Analyse der mit dem FITC-Lipopeptid markierten Zellen bei höheren Lipopeptidkonzentrationen keinen Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen den verschiedenen Tumorzellen ergab, war das Fluoreszenzmaximum der markierten B-Lymphomzellen in allen Experimenten bei einer Lipopeptidkonzentration von 10 ug/ml im Vergleich zu den unmarkierten Zellen merklich verschoben. Bei den T-Lymphomzellen und den Mastocytomzellen war in zwei von drei Experimenten keine erhöhte Fluoreszenz zu beobachten, sondern erst bei einer Verdopplung der Lipopeptidkonzentration. Dieser Befund deutet darauf hin, daß es möglicherweise Unterschiede in der Bindungsfähigkeit zwischen mitogenreaktiven und nichtreaktiven Zellen gibt, und unterstützt die Hypothese, daß auf der Oberfläche von B-Zellen Lipopeptidspezifische Bindungsstellen existieren. Bei niedrigen Lipopeptidkonzentrationen, die im übrigen visuell im Fluoreszenzmikroskop nicht analysiert werden können, würde das Molekül bevor-

zugt an eine spezifische Oberflächenstruktur binden, während es mit zunehmender Mitogenkonzentration zu einer unspezifischen Interaktion mit verschiedenen Membrankomponenten käme. Beide Effekte würden sich überlagern und könnten nicht mehr voneinander unterschieden werden.

Mit LPS und Lipid A, die ebenso wie synthetische Lipopeptide B-Lymphozyten polyklonal aktivieren, wurden bei Bindungsstudien widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Durch Immunfluoreszenzstudien konnte gezeigt werden, daß von den 50%-60% der Milzlymphozyten, die LPS gebunden hatten, 80% membrangebundenes IgM besaßen. Demnach bindet LPS vorwiegend an reife B-Lymphozyten und nur zu einem geringen Teil an T-Lymphozyten und andere Immunzellen (44). Mit ^{3}H-LPS wurde allerdings sowohl für B- als auch für T-Zellen ein Bindungsmaximum nach 12 h gefunden (43). Mit Meerrettichperoxidase-markiertem LPS konnte weiterhin ein deutlicher Unterschied in der Bindungsfähigkeit von LPS-Nonresponder- und Respondermilzzellen nachgewiesen werden (38), während zahlreiche andere Autoren (39-41) mit ^{3}H-LPS und ^{125}J-markiertem Lipid A diesen Befund nicht unterstützen konnten, obwohl nur Zellen aus LPS-Respondern durch LPS aktiviert werden.
Die Bindungsstudien mit ^{125}J-markiertem Lipid A (42) müssen allerdings kritisch bewertet werden. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Lipid A ist es nicht ausgeschlossen, daß ebenso wie bei synthetischen Lipopeptiden neben einer möglichen Bindung an eine spezifische Oberflächenstruktur eine unspezifische Interkalation in die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran erfolgt. In höheren Konzentrationen neigt Lipid A außerdem zur Aggregatbildung, wodurch keine Quantifizierung der Mitogenbindung an die Lymphozytenoberfläche möglich ist. Weiterhin enthält Lipid A, das durch saure Hydrolyse von LPS isoliert wurde, keine funktionellen Gruppen, die sich jodieren lassen. Möglicherweise waren die Lipid A-Präparationen durch Proteine verunreinigt, die sich radiomarkieren ließen und gleich gut von Responder- und Nonresponder-Lymphozyten gebunden wurden.

Bei allen verwendeten Tumorzellinien wurde beobachtet, daß sich bei Raumtemperatur die zellgebundene Fluoreszenz in einer kap-

penförmigen Struktur sammelte. Die Kappenbildung ist ein Parameter, der häufig benutzt wird, um die intrinsische Fähigkeit von Lymphozyten abzuschätzen, durch eine Substanz aktiviert zu werden. Wahrscheinlich existieren jedoch mindestens zwei verschiedene Mechanismen, durch die die Bildung einer kappenförmigen Struktur auf der Zelloberfläche nach Wechselwirkung eines Liganden mit der Plasmamembran ausgelöst wird. Dazu zählt die energieabhängige Bewegung von aggregierten Rezeptoren unter Beteiligung des Cytoskeletts, die durch verschiedene Drogen inhibiert werden kann. Dieser Prozeß wird auch durch Substanzen wie Cholesterin oder Fettsäuren, die eine Perturbation der Zellmembran auslösen, beeinflußt. Daneben wurde ein Mechanismus der Kappenbildung gefunden, der unabhängig von der Funktionsfähigkeit des Cytoskeletts ist. Die Akkumulation von Proteinkomplexen an einem Zellpol wird als Folge einer gerichteten Bewegung von Membranlipiden angesehen (132, 60). Dieser Effekt der Aggreat- und Kappenbildung kann allerdings unter bestimmten Bedingungen auch bei Lipidvesikeln beobachtet werden, in die ein fluoreszierendes Lipid eingebaut wurde (133). Dies bedeutet, daß die Ausbildung einer Kappe nach Bindung eines Mitogens an die Zelloberfläche nicht vom Vorhandensein spezifischer Mitogenbindungsstellen abhängig ist.

Nach der Bindung an die Lymphozytenoberfläche müssen die als Signalmoleküle wirkenden Liganden (Antikörper, Wachstumsfaktoren, Hormone, Neurotransmitter) inaktiviert werden, damit es nicht zu einer Daueraktivierung der Zelle kommt. Dies erfolgt entweder durch extrazelluläre Enzyme, durch Verringerung der Affinität zum Rezeptor oder durch einen Mechanismus, der als antigene Modulation bezeichnet wird. Die Bindung eines Liganden an Oberflächenproteine führt zur Bildung von Mikroaggregaten, die unregelmäßig über die gesamte Zelloberfläche verteilt sind ("patching"). Die Aggregatbildung ist unabhängig vom Zellstoffwechsel und erfolgt bei Temperaturen über 4°C. Bei 37°C bildet sich innerhalb von 1-2 h am Uropod eine kappenförmige Struktur ("capping"). Diese gerichtete Bewegung der aggregierten Ligand-Rezeptor Komplexe zu einem bestimmten Pol der Zelle kann durch Inhibitoren der Atmungskette (z.B. Natriumazid, Dinitrophenol)

oder der Glykolyse (z.B. Natriumfluorid, Jodacetamid) unterbunden werden (57). Die kappenförmig aggregierten Ligand-Rezeptor Komplexe werden entweder durch rezeptorabhängige Endocytose internalisiert oder von der Zelloberfläche abgeschilfert ("shedding"). Als Folge davon kommt es zu einer verminderten Expression der spezifischen Membranrezeptoren. Die Reexpression dieser Oberflächenmoleküle erfolgt sowohl durch Neusynthese als auch durch ein Zurückleiten des Rezeptors zur Zelloberfläche.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß bei den Tumorzellen, die bei Raumtemperatur ohne Natriumazid inkubiert wurden, nach etwa 2 h die Fluoreszenz von der Zelloberfläche verschwunden war. Im Kulturüberstand konnten dagegen zahlreiche fluoreszierende Partikel nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet auf eine Abschilferung des gebundenen Lipopeptids hin. Fluoreszierende Vakuolen wurden nicht beobachtet. Eine Internalisierung des membrangebundenen Lipopeptids durch die Tumorzellen kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Die mit FITC-Lipopeptid markierten Milzlymphozyten verhielten sich ähnlich. In einigen Fällen waren neben abgeschilferten Membranteilen deutlich fluoreszierende Vakuolen zu beobachten. Dies deutet darauf hin, daß zusätzlich eine Internalisierung des gebundenen Lipopeptids erfolgen kann. Allerdings konnte nicht gezeigt werden, ob die Vakuolenbildung durch rezeptorabhängige Endocytose oder durch Phagozytose von abgeschilferten Membranteilen erfolgte.
Inwieweit T-Lymphozyten und Thymuszellen gebundenes Lipopeptid aufnehmen, konnte mit dem FITC-Lipopeptid nicht zweifelsfrei geklärt werden. Untersuchungen mit ^{3}H-LPS zeigten (57), daß bei kontinuierlicher Anwesenheit des markierten Mitogens der membrangebundene Anteil durch B-Lymphozyten internalisiert wurde, während er auf der Oberfläche von T-Lymphozyten mehr als 48 h nachgewiesen werden konnte. Die Aufnahme ins Zellinnere der B-Zellen war erst 6 h nach der Inkubation mit ^{3}H-LPS deutlich nachweisbar. Eine Analyse der markierten Verbindungen ergab, daß das von den B-Zellen internalisierte Mitogen degradiert wurde, das von den T-Zellen gebundene LPS dagegen nicht nachweisbar verändert wurde.

5.3 Wirkung synthetischer Lipopeptide auf das Wachstum und die Differenzierung der humanen promyeloischen Leukämiezellinie HL-60

Bisher war bekannt, daß synthetische Lipopeptide vor allem B-Lymphozyten verschiedener Spezies polyklonal aktivieren und neben einer Zellteilung die Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen auslösen. Weiterhin konnte eine biologische Wirkung dieser Substanzen auf Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden (23). Von G. Grygar konnte gezeigt werden, daß humane Granulozyten durch TPP stimuliert werden (22). Diese Zellpopulation spielt im Rahmen der zellulären Immunabwehr eine wichtige Rolle. Polymorphkernige Granulozyten bilden, da sie rein zahlenmäßig mit 55-70% die größte Population innerhalb der Leukozyten darstellen (neutrophile Granulozyten 55-70%, eosinophile Granulozyten 2-4%, basophile Granulozyten 0-1%, Lymphozyten 25-40%, Monozyten 2-6%), den ersten Abwehrmechanismus des Organismus gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen, aber auch gegen Immunkomplexe und Zelltrümmer.

Bei der Hämatopoese entwickeln sich aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks verschiedene spezialisiertere Vorläuferformen, darunter die myeloischen Stammzellen und die Vorläufer der Lymphozyten. Aufgrund morphologischer Unterschiede lassen sich die verschiedenen Differenzierungsstadien der myeloischen Reihe folgendermaßen einteilen: Myeloblast, Promyelozyt, Myelozyt, Metamyelozyt, Granulozyt. Aus juvenilen Promyelozyten entwickeln sich auch die Monozyten. Die Vermehrung und Differenzierung dieser Zellen wird durch verschiedene Proteine reguliert. Die wichtigste Rolle spielen dabei die Kolonie-Stimulierenden Faktoren (CSF). Bisher konnten vier verschiedene CFS's aus Mauszellen isoliert und charakterisiert werden (134). GM-CSF stimuliert die Bildung von Granulozyten und Makrophagen, G-CSF bevorzugt von Granulozyten, M-CSF (CSF-1) von Makrophagen und Multi-CSF (Interleukin-3) die Bildung von Granulozyten und Makrophagen, aber auch von Mastzell-, Megakaryozyten- und Erythrozyten-Vorläuferzellen.

Inzwischen wurden, insbesondere durch die Arbeiten von L. Sachs, eine Reihe chemisch völlig verschiedener unphysiologischer Substanzen entdeckt, die *in vitro* eine Differenzierung von unreifen myeloischen Zellen auslösen können (135). Die meisten bisher durchgeführten Experimente erfolgten mit der Zellinie HL-60, die aus einem Patienten mit akuter promyeloischer Leukämie etabliert wurde (94). Bei dieser Leukämieform ist die normale Kopplung von Zellwachstum und Differenzierung aufgehoben. Dadurch kommt es zu einer unkontrollierten Proliferation der Promyelozyten und zu einem vermehrten Auftreten unreifer Granulozyten- und Monozytenvorstufen im Blut (Blastenschub). Durch Zusatz des physiologischen Differenzierungsfaktors GM-CSF zu den Leukämiezellen ist es möglich, daß die malignen Zellen zu Granulozyten und/oder Makrophagen ausdifferenzieren und damit ihr Zellwachstum einstellen. LPS und Dimethylsulfoxid gehören zu den Verbindungen, die ebenfalls eine Proliferationshemmung und Differenzierung von Promyelozyten auslösen. LPS induziert vermehrt die Bildung von Makrophagen (135), während unter dem Einfluß von Dimethylsulfoxid Myelozyten, Metamyelozyten und segmentkernige Neutrophile entstehen (136).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei promyeloischen Leukämiezellen, die in Gegenwart des synthetischen Lipopeptids TPP kultiviert wurden, eine verringerte Proliferation und eine damit verbundene Differenzierung der Zellen auftrat. Damit konnte ein weiterer biologischer Effekt dieser dem N-Terminus von bakteriellem Lipoprotein analogen Verbindung nachgewiesen werden. Der Effekt auf die HL-60 Zellen war dosis- und zeitabhängig. Die Wachstumshemmung lag unter den Zellkultivierungsbedingungen nach 3 Tagen bei 37% und nach 7 Tagen bei 43%. Eine vollständige Inhibition der Proliferation konnte nicht erzielt werden. Die morphologische Charakterisierung dieser Zellen ergab, daß neben den ursprünglich eingesetzten Promyelozyten Myelozyten, aber auch Metamyelozyten und Monozyten-ähnliche Zellen auftraten. Da nur die Metamyelozyten und Granulozyten/Makrophagen ihre Fähigkeit zur Teilung verloren haben, diese Zellen aber nur einen Teil der Gesamtpopulation ausmachten, läßt sich

daraus die unvollständige Proliferationshemmung erklären. Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen von L. Sachs, der nachwies, daß durch die verschiedenen Differenzierungsinduktoren nicht unbedingt die Bildung der reifen, ausdifferenzierten Formen ausgelöst wird (135). Weiterhin konnte er anhand von Oberflächenmarkern zeigen, daß in Abhängigkeit von der jeweiligen Substanz verschiedene Differenzierungsstadien ausgelöst wurden.
Der Nachweis auf NCA, das von reifen Granulozyten exprimiert wird, nicht jedoch von Promyelozyten, verlief negativ. Dieses Ergebnis erklärt sich dadurch, daß durch TPP die Bildung von Monozyten-ähnlichen Zellen, nicht jedoch von Granulozyten ausgelöst wird.

Der biologische Effekt von LPS auf diesen HL-60 Klon entsprach dem von TPP. Allerdings war der inhibitorische Einfluß auf die Zellproliferation mit 20% am Tag 7 deutlich geringer als bei TPP. Eine Differenzierung der Promyelozyten zu reiferen Formen erfolgte nur bis zum Myelozyten, und der Nachweis auf NCA verlief negativ. Wie durch S.D. Luikart et al. gezeigt wurde (137), kann die Fähigkeit einer bestimmten Verbindung, eine Zelldifferenzierung auszulösen, bei den verschiedenen HL-60 Subklonen variieren.
Mit Dimethylsulfoxid dagegen konnte eine deutliche Hemmung der Zellteilung induziert werden. Weiterhin war eine Differenzierung der Promyelozyten zu Granulozyten nachweisbar. Dieses Ergebnis entspricht damit Befunden von J. Collins und Mitarbeitern (136). Von dieser Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, daß tatsächlich funktionelle Granulozyten gebildet werden. Dennoch wurde in dieser Arbeit eine Expression von NCA, wie sie bei Granulozyten aus dem peripheren Blut gezeigt wurde, nicht beobachtet. Bisher ist allerdings über das zeitliche Auftreten dieses Oberflächenmoleküls im Laufe der Differenzierung vom Promyelozyten bis zur reifen Zelle zu wenig bekannt. Offensichtlich existieren neben den morphologisch erfaßbaren Stadien weitere, die sich vor allem in ihrem Membranproteinmuster unterscheiden. Solche Analysen mit Hilfe monoklonaler Antikörper waren allerdings nicht verfügbar.

5.4 Bedeutung des Phosphoinositstoffwechsels bei der Lymphozytenaktivierung durch Lipopeptide

Die Frage nach der Natur der an der Aktivierung beteiligten Rezeptoren, nach dem eigentlichen Signal zur Auslösung der Lymphozytenaktivierung und nach der Weiterleitung dieses Signals von der äußeren Plasmamembran in das Zellinnere ist bisher ungeklärt. Die Gründe hierfür liegen in der Heterogenität der Lymphozyten selbst, aber auch in der Tatsache, daß man nicht in der Lage ist, frühe Membraneffekte nach der Stimulierung von Lymphozyten einem einzigen stimulierten Lymphozyten zuzuordnen. Zu den Modellsubstanzen, die B-Zellen polyklonal aktivieren, d.h. unabhängig von der Spezifität des Antigenrezeptors, und die eine Proliferation und Differenzierung auslösen, gehören die bakteriellen Zellwandbestandteile Lipoprotein und LPS sowie synthetische, dem N-Terminus von Lipoprotein analoge Lipopeptide.
Das bisher am besten untersuchte Signalsystem, das bei Peptidhormonen die entscheidende Rolle spielt, benutzt als sekundären Botenstoff cAMP. Die Bindung des Signalmoleküls an seinen spezifischen Oberflächenrezeptor aktiviert unter Mitwirkung eines Überträgerproteins eine membrangebundene Adenylatcyclase, die an der Membraninnenseite die Bildung von cAMP katalysiert. cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase A, wodurch sich die katalytische Untereinheit ablöst und so spezifisch Proteine phosphoryliert, die die zelluläre Reaktion steuern (55). Dieser Mechanismus der Signalübertragung scheint bei der Lymphozytenaktivierung allerdings keine Rolle zu spielen, denn eine positive Korrelation zwischen der Mitogenität verschiedener Substanzen und der Bildung von cAMP wurde nicht gefunden (138).

Neben der Phosphorylierung von Membran- und cytoplasmatischen Proteinen durch cAMP-, cGMP- und Ca^{2+}/CaM-abhängige Proteinkinasen, die von einigen Arbeitsgruppen als entscheidendes intrazelluläres Signal auf externe Stimulierung angesehen wird, spielt für eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen die Proteinkinase C eine bedeutende Rolle bei der Übertragung des Ak-

tivierungssignals von der Plasmamembran ins Zellinnere. Diese Kinase ist ein Calcium- und Phospholipid-abhängiges Enzym, welches durch 1,2-Diacylglycerin aktiviert wird, wohingegen Mono- und Triacylglycerin sowie freie Fettsäuren inaktiv sind. DG, das die Affinität des Enzyms für Calciumionen erhöht, kommt normalerweise nicht in der der Plasmamembran vor, wird aber vorübergehend als Antwort auf extrazelluläre Signale durch Spaltung von $PtdInsP_2$ gebildet. Bei der Rezeptor-vermittelten Hydrolyse von $PtdInsP_2$ wird außerdem IP_3 gebildet, das ebenfalls als sekundärer Botenstoff wirkt und die Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Reticulum auslöst. Bei der Inaktivierung von IP_3 entsteht IP_2, das durch eine spezifische Phosphatase zu D-Inositmonophosphat abgebaut wird. Normalerweise wird dieses Zwischenprodukt zu Inosit hydrolysiert; diese Reaktion wird durch Zusatz von 5 mM LiCl gehemmt. Damit besitzt man ein empfindliches Nachweissystem, um die Spaltung von $PtdInsP_2$ als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli zu untersuchen.

Die Aktivierung von T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor/T3-Komplex führte ebenso wie die polyklonale Aktivierung durch pflanzliche Lektine zur Bildung von IP_3 und DG (76). Die polyklonale Aktivierung von B-Lymphozyten durch anti-IgM löste ebenfalls die Hydrolyse von Polyphosphoinositlipiden aus (78). Für die LPS-induzierte B-Zellaktivierung konnte dagegen keine Aktivierung des PI-Stoffwechsels nachgewiesen werden (77). Auch mit dem synthetischen Lipopeptid TPP, welches ebenfalls als B-Zell-Mitogen wirkt, konnte keine vermehrte Freisetzung von Inositphosphaten induziert werden, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Bei der Aktivierung von B-Lymphozyten mit LPS wurde eine Translokation der PK-C vom Cytosol an die Plasmamembran beschrieben, ohne daß eine Hydrolyse von Inosit-Phospholipiden erfolgte (78). Nach diesem Befund scheint die PK-C auch bei der LPS-induzierten B-Zellaktivierung eine Rolle zu spielen. Möglicherweise aktiviert LPS das Enzym *in vivo* direkt. Vorstufen von Lipid A, des für die biologische Aktivität von LPS verantwortli-

chen Teils, sowie Lipid A selbst sind imstande, die aus einer Makrophagenzellinie isolierte PK-C direkt zu aktivieren (139). Tumorpromotoren wie TPA imitierenden biologischen Effekt von DG, indem sie die PK-C irreversibel aktivieren. Es wird diskutiert, daß diese Wirkung auf einer gewissen Strukturähnlichkeit mit 1,2-Diacylglycerin beruht (75). Die synthetischen Lipopeptide, die dem bakteriellen LPS vergleichbare polyklonale B-Zell-Aktivatoren sind, enthalten ebenfalls die für die Aktivierung der PK-C notwendige Diacylglycerin-Struktur. Allerdings wurde mit synthetischen Diacylglycerinanaloga festgestellt, daß insbesondere die 3-Hydroxylgruppe des sn-1,2 DG für die biologische Aktivität essentiell ist (140). Demgegenüber induziert Teleocidin, das weder den Phorboldiestern noch DG strukturell ähnlich ist, bei T-Zellen ähnliche Effekte wie TPA (76). Dieses Ergebnis bedeutet, daß eine Strukturähnlichkeit der Tumorpromotoren mit DG keine Voraussetzung für ihre biologische Aktivität ist.

Für das Peptidhormon Glucagon wurde beschrieben (141), daß eine Weiterleitung des Signals von der Membranaußen- zur Membraninnenseite nicht nur über eine Aktivierung der Adenylatcyclase erfolgt, sondern wahrscheinlich auch durch eine Hydrolyse von Polyphosphoinosit. Offensichtlich gibt es mindestens zwei verschiedene Glucagonrezeptoren. Dieser Befund steht im Gegensatz zu früheren Experimenten, nach denen die Wirkungsweise dieses Hormons ausschließlich mit der Bildung von cAMP als sekundärem Botenstoff erklärt wurde. Demnach ist es also möglich, daß durch ein Signalmolekül verschiedene Reaktionsketten der Signalweiterleitung aktiviert werden.

DG scheint nicht nur durch Hydrolyse von $PtdInsP_2$ gebildet zu werden, da nach der Aktivierung der promyeloischen Leukämiezellinie HL-60 mit Phorbol-12,13-dibutyrat neben Phosphocholin auch DG freigesetzt wurde. Möglicherweise wird eine Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C direkt oder indirekt durch die PK-C aktiviert (142). Inzwischen wurde die Isolierung eines solchen Enzyms beschrieben; allerdings ist der Einfluß der PK-C auf dieses Enzym noch nicht bekannt.

Eventuell wirken die polyklonalen B-Zell-Aktivatoren TPP und LPS über bisher noch nicht untersuchte Mechanismen. Bei T-Lymphozyten konnte gezeigt werden (143), daß im Gegensatz zum antigenspezifischen Aktivierungssignal die Wirkung von Interleukin-2 nicht über eine Hydrolyse von $PtdInsP_2$ verläuft. Dieser T-Zell Wachstumsfaktor induziert ebenso wie bestimmte Lektine einen vermehrten ^3H-Thymidineinbau in die DNA und eine polyklonale Proliferation der Zellen. Die Bindung von Interleukin-2 an stimulierte T-Lymphozyten aktiviert das Na^+-H^+-Transportsystem und führt wie nach der Antigen- oder Lektinstimulation zu einer Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes. Daneben wurde bei der Aktivierung mit Interleukin-2 eine Translokation der PK-C vom Cytoplasma an die Plasmamembran beobachtet (144). Ähnliche Änderungen des Zellstoffwechsels wurden nach der Aktivierung von B-Lymphozyten mit LPS oder anti-IgM beobachtet. Der B-Zell-Stimulierungsfaktor-1 (BSF-1 oder Interleukin-4), der wie TPA eine vermehrte Expression der Ia-Antigene auf der Membranoberfläche von B-Lymphozyten induziert und zusammen mit submitogenen Mengen anti-IgM eine Zellproliferation auslöst, wirkt im Gegensatz zu anti-IgM nicht über eine vermehrte Hydrolyse von Polyphosphoinosit. Zusammenfassend ergibt sich daraus, daß trotz gleicher zellulärer Antworten, die durch die Bindung eines Signalmoleküls an die Zelloberfläche hervorgerufen werden, die Weiterleitung des Aktivierungssignals durch die Plasmamembran über unterschiedliche Mechanismen erfolgen kann.

5.5 Phosphorylierung von Lymphozytenproteinen während der Zellaktivierung durch bakterielle B-Zell-Mitogene

Eigene Untersuchungen sowie Befunde anderer Arbeitsgruppen (77,78) zeigten, daß die Hydrolyse von $PtdInsP_2$, die bei polyklonal aktivierten T-Lymphozyten eine entscheidende Funktion bei der Weiterleitung des Aktivierungssignals besitzt, für die polyklonale B-Zell-Aktivierung durch synthetische Lipopeptide und LPS keine Rolle spielt. Es werden deshalb verschiedene andere Stoffwechselwege für die Initiation der B-Zell-Aktivierung

durch diese Mitogene diskutiert. Da Rezeptor- und Enzymfunktionen durch Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Mechanismen reguliert werden und verschiedene Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Hormone und Neurotransmitter Phosphoproteine sind, sollte in dieser Arbeit der Einfluß von TPP und LPS auf die Phosphorylierung von Membranproteinen untersucht werden. Die Ergebnisse wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Dr. B. Kleine erstellt (146).

Die Phosphorylierung von membrangebundenen und cytoplasmatischen Proteinen wird durch verschiedene Proteinkinasen katalysiert, deren Aktivitätszustand durch unterschiedliche Effektoren reguliert wird. Am besten charakterisiert sind die Diacylglycerin-, die cAMP-, die cGMP- und die Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen. Die Modifikation durch Phosphatgruppen erfolgt vor allem an den Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Daneben wurden Cysteinthiophosphorester, Phosphorsäureamide von Lysin und Histidin und Säureanhydride der Glutamin- und Asparaginsäure gefunden (147). Einige dieser Verbindungen treten als Intermediate bei enzymatischen Reaktionen auf. Aufgrund der Häufigkeit in der Zelle und der chemischen Stabilität lassen sich allerdings nur die Proteine gut analysieren, die Phosphoserin, Phosphothreonin oder Phosphotyrosin enthalten.

In dieser Arbeit konnten in Milzlymphozyten aus Nacktmäusen nach einer vierstündigen mitogenen Aktivierung wenigstens 15 verschiedenen phosphorylierte Membranproteine nachgewiesen werden. Die Mehrzahl dieser Proteine wurde allerdings auch bei unstimulierten Zellen gefunden. Lediglich zwei saure Proteine von 60 kDa und 15 kDa wurden identifiziert, die verstärkt von den aktivierten Lymphozyten exprimiert wurden. Nach einer vierzigstündigen Voraktivierung ruhender B-Lymphozyten mit TPP oder LPS konnten wenigstens 40 verschiedene phosphorylierte Membranproteine nachgewiesen werden, wobei zusätzlich zu den 15 Phosphoproteinen, die während der vierstündigen Markierung synthetisiert wurden, im Laufe der Zellaktivierung und -teilung etwa 25 weitere Membranproteine phosphoryliert wurden. Unter diesen befanden sich Proteine, die aufgrund ihrer elektrophore-

tischen Mobilität den schweren Ketten der MHC-Antigene der Klasse I entsprachen. Eine Identifizierung der übrigen Proteine war wegen fehlender Referenzproteine nicht möglich.

Untersuchungen von A. Johnstone über die Phosphorylierung von Membranproteinen bei ruhenden und kurzzeitig aktivierten B- und T-Lymphozyten ergaben, daß von diesen Zellen zwei saure Phosphoproteine von 90 kDa und 52 kDa eprimiert wurden, unabhängig von der Population und dem Aktivierungszustand der Zellen. Daneben wurden die MHC-Antigene der Klasse I als Phosphoproteine identifiziert (148). Eine Phosphorylierung der membrangebundenen Immunglobuline und der MHC-Antigene der Klasse II wurde nicht beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Befunden von D. Chaplin et al., die in der Plasmamembran von humanen Lymphozyten wenigstens 12 bis 24 verschiedene Phosphoproteine nachweisen konnten (149). Ein weiteres phosphoryliertes Membranprotein, das inzwischen identifiziert werden konnte, ist das B1- (150) oder CD20-Antigen mit einer relativen Molekülmasse von 32-35 kDa.

Ein Vergleich mit den in dieser Arbeit gefundenen phosphorylierten Membranproteinen zeigte, daß nur die MHC-Antigene der Klasse I übereinstimmend auftraten. Ein 90 kDa-Protein wurde nicht gefunden, während das 52 kDa-Protein nicht zweifelsfrei zugeordnet werden konnte. Der Grund für diese divergierenden Befunde liegt wahrscheinlich an den abweichenden experimentellen Bedingungen, insbesondere bei den Markierungs- und Isolierungsmethoden der Membranproteine. In den eigenen Experimenten erfolgte die Isolierung der hydrophoben und damit in der Regel membrangebundenen Proteine durch einen Triton X-114-haltigen Solubilisierungspuffer und anschließender Gewinnung der Detergensphase nach Bordier (102). Dies führte zu praktisch identitischen Präparationen radiomarkierter Verbindungen aus der Membranfraktion und zu reproduzierbaren 2D-Proteinmustern. Geringe Unterschiede im Proteinmuster, die manchmal zwischen unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten auftraten, können im übrigen nicht die unterschiedliche Zahl der gefundenen Phosphoproteine erklären. A. Johnstone und Mitarbeiter

isolierten die Membranproteine, indem sie die markierten Zellen mit Ultraschall lysierten und aus dem Zellysat die mikrosomale Fraktion präparierten (148). Diese Methode hat den Nachteil, daß größere Mengen an Zellen und an Radioaktivität als bei der Extraktion der hydrophoben Proteine mit Triton X-114 benötigt werden. Weiterhin wurden im Unterschied zu den eigenen Experimenten die ruhenden Lymphozyten vor der polyklonalen Aktivierung mit radioaktivem Phosphat vorinkubiert, wodurch mögliche Artefakte, ausgelöst durch Veränderungen der intrazellulären Phosphatmenge aufgrund des mitogenen Stimulus, vermieden werden sollten.

Keinen wesentlichen Effekt auf die unterschiedliche Zahl der gefundenen phosphorylierten Membranproteine hatte wahrscheinlich der verwendete Mausstamm. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die TPP-stimulierten Milzzellen aus einem LPS-Nonresponder- und zwei damit verwandten LPS-Responderstämmen, von denen einer keine reifen T-Zellen besitzt, nahezu ein identisches Muster von Phosphoproteinen exprimierten. Diese Ergebnis ist zugleich ein weiterer Hinweis dafür, daß durch bakterielles Lipoprotein bzw. dessen synthetische Analoga nur B-Lymphozyten polyklonal aktiviert werden, nicht jedoch T-Lymphozyten.

Der Vergleich des Phosphoproteinmusters von TPP- und LPS-aktivierten Milzlymphozyten aus Nacktmäusen, die 40 h mit dem jeweiligen Mitogen voraktiviert waren, ergab eine unterschiedliche Phosphorylierung zweier Membranproteine. Von des LPS-aktivierten Zellen wurden zwei saure Phosphoproteine von 60-63 kDa und 17 kDa exprimiert, die bei einer Stimulation der B-Zellen mit TPP nicht gefunden wurden. Damit konnte zum erstenmal nachgewiesen werden, daß die unterschiedliche biologische Wirkung der beiden B-Zell-Mitogene TPP und LPS gegenüber B-Lymphozyten eines bestimmten Mausstamms auf spezifisch in den reaktiven Zellen exprimierte Proteine zurückgeführt werden kann. Diese Unterschiede wurden bisher nur bei voraktivierten, nicht jedoch bei kurzzeitig stimulierten Lymphozyten gefunden. Der Grund hierfür liegt möglicherweise darin, daß nicht alle wäh-

rend der 4 h-Markierung phosphorylierten Membranproteine detektiert wurden.

Ob einem dieser Proteine eine Schlüsselrolle bei der Übertragung des Aktivierungssignals zukommt, kann aufgrund der wenigen verfügbaren Daten nicht beurteilt werden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß es innerhalb weniger Minuten nach der mitogenen Stimulation der Zellen nicht nur zu einer spezifischen Phosphorylierung von Membranproteinen kommt, sondern auch zu einer nachfolgenden Dephosphorylierung. Diese Proteine würden einer Analyse entgehen, da nur solche Phosphoproteine erfaßt wurden, die nach einer vierstündigen Stimulierung der Zellen markiert waren. Hierzu sind in Zukunft weitere Untersuchungen erforderlich.

Obwohl eine Aktivierung der PK-C durch Hydrolyseprodukte von $PtdInsP_2$ weder bei TPP- noch bei LPS-aktivierten B-Lymphozyten gefunden wurde, wird eine direkte Aktivierung dieses Enzyms durch diese lipophilen Mitogene diskutiert (139). Inzwischen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen einige cytoplasmatische und membrangebundene Proteine identifiziert, die *in vitro* als Substrate der PK-C wirken. Dazu gehören die integralen Membranproteine wie der Interleukin-2-Rezeptor, die schweren Ketten der MHC-Antigene der Klasse I, das T200-Antigen, der Transferrinrezeptor, das Glucosetransportprotein und der Rezeptor für den Epidermiswachstumsfaktor (151). Diese Untersuchungen wurden allerdings mit humanen T-Lymphozyten oder T-Lymphomzellen durchgeführt, nicht jedoch mit Maus-B-Lymphozyten. Ein weiteres Substrat der PK-C, das p36, ist auch ein Substrat eines viralen Onkogenprodukts, nämlich der tyrosinspeziischen Proteinkinase ($pp60^{v-src}$) des Rous Sarcoma Virus (152). In B-Lymphozyten wurde nach anti-IgM Stimulation ein phosphoryliertes Membranprotein von 29 kDa gefunden, desweiteren cytoplasmatische Proteine von 94, 66, 60, 56, 50, 43, 38, 35, 28-30, 20-23 und 15-18 kDa (153). E. Snow *et al.* konnten aus isolierten Membranen von TPA-stimulierten B-Lymphozyten nach Inkubation mit (^{32}P)ATP wenigstens 10 phosphorylierte Proteine nachweisen. Diese Pro-

teine wurden nicht bei einer Vorinkubation der Membranen mit einem spezifischen Inhibitor der PK-C gefunden (154).

Ein Vergleich dieser Phosphoproteine mit den in dieser Arbeit gefundenen phosphorylierten Proteinen ist aufgrund der verschiedenen Zellpopulationen, der verschiedenen Stimuli und der unterschiedlichen Membranproteinisolierungsmethoden nur eingeschränkt möglich. Dennoch sprechen die bisherigen Daten - wie andere Ergebnisse in dieser Arbeit - eher gegen eine Schlüsselrolle der PK-C bei der Aktivierung von B-Lymphozyten durch synthetische Lipopeptide oder LPS. Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Interleukin-4. Dieser B-Zell-Stimulierungsfaktor induziert ebenso wie TPP und LPS keine Hydrolyse von $PtdInsP_2$ und soll eine spezifische Phosphorylierung endogener Proteine ohne Beteiligung der PK-C induzieren (155). Hinzu kommt, daß bisher kein physiologischer Stimulus gefunden wurde, der eine Phosphorylierung des Interleukin-2-Rezeptors induziert. Diese Proteinmodifikation wurde nämlich nur bei der Aktivierung von Lymphozyten mit TPA beobachtet, nicht dagegen bei der Bindung des Interleukin-2 an seinen Rezeptor.

Neben der Proteinkinase C gibt es in der Zelle verschiedene andere Kinasen, die sowohl die Phosphorylierung von cytoplasmatischen als auch von membrangebundenen Proteinen katalysieren. Es konnte gezeigt werden, daß diese Kinasen während der Stimulation von Lymphozyten aktiviert werden (156). Unklar ist jedoch, welche Bedeutung den einzelnen Enzymen bei der Weiterleitung des Aktivierungssignals von der Membranaußenseite ins Zellinnere zukommt.
Vor einiger Zeit wurde die Diskussion über die Bedeutung der Phosphorylierung von Membranproteinen durch die Entdeckung neu belebt, daß einige Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Hormone und Neurotransmitter phosphoryliert sind und zugleich Proteinkinaseaktivität besitzen. Inzwischen wurden die Rezeptoren für den Epidermis-, den Nerven- und den Blutplättchenwachstumsfaktor, Somatomedin C, Insulin, Östrogen und Progesteron als phosphorylierte Kinasen identifiziert (87). Im Gegensatz zu

den meisten phosphathaltigen Zellproteinen sind diese Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert. Normalerweise beträgt der Anteil von Phosphotyrosin nur 0,02% bis 0,06% der gesamtem proteingebundenen Phosphatmenge, erhöht sich aber unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren und in transformierten Zellen auf das Fünf- bis Zehnfache (147). Die Aktivierung der katalytischen Domäne und die daraus resultierende Autophosphorylierung der Rezeptoren wird von außen durch die Bindung des jeweiligen physiologischen Liganden reguliert. Die Bedeutung dieser Autophosphorylierung, insbesondere die Funktion der Phosphorylierung von Tyrosinresten, für die Rezeptorfunktion ist ungeklärt, scheint aber eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und -transformation zu spielen. Die Identifizierung und Charakterisierung der verschiedenen viralen Onkogene ergab nämlich, daß eine Reihe von ihnen tyrosinspezifische Kinaseaktivität aufweisen. Es sind inzwischen einige Zellproteine bekannt, die nach Transformation durch ein Onkogen der scr-Familie (Prototyp ist das $pp60^{v\text{-}scr}$ des Rous Sarcoma Virus) an Tyrosinresten phosphoryliert werden (157). Im übrigen legt die Parallele zwischen Kinaseaktivität und Lokalisation von Wachstumsrezeptoren einerseits und von Produkten der scr-Gen-Familie andererseits nahe, daß die durch Wachstumsfaktoren induzierte Zellteilung über ähnliche molekulare Prozesse verläuft wie die Wirkung der genannten Onkogenprodukte.

Wenig bekannt ist darüber, wie die Phosphorylierung die Funktion der Membranproteine beeinflußt. Integrale Membranproteine besitzen in ihrem cytoplasmatischen Abschnitt nahe der Innenseite der Plasmamembran gehäuft basische Aminosäuren. Diese Sequenzbereiche interagieren wahrscheinlich mit negativ geladenen Phospholipiden der Lipiddoppelschicht und verankern so das Protein in der Plasmamembran. Die Phosphorylierung eines nahe der Membran gelegenen Serin- oder Threoninrestes könnte die Wechselwirkung des phosphorylierten Proteins mit der Zellmembran oder mit Cytoskelettproteinen beeinflussen (151). Aus T-Leukämiezellen wurde ein Faktor isoliert, der bei einer Nicht-T-Zellinie die Synthese und Expression des hochaffinen, nichtphosphorylierten Interleukin-2-Rezeptors induzierte. Im Gegen-

satz dazu wurde durch TPA die Bildung des niedrigaffinen, nichtfunktionellen Interleukin-2-Rezeptors ausgelöst; dieser Rezeptor trug an einer Serinseitenkette einen Phosphatrest (155). Nach der Bindung von Interleukin-2 an seinen Rezeptor wurde ebenfalls eine Abnahme der hochaffinen Bindungsstellen bei gleichzeitiger Zunahme der Gesamtzahl der Bindungsstellen beobachtet. Durch Phorboldiester wurde bei Lymphozyten eine Phosphorylierung des Insulinrezeptors induziert, wobei die Zahl der Ligandenbindungsstellen daraufhin abnahm. Ein ähnlicher Befund wurde in Gegenwart von TPA nach der Bindung von Transferrin an seinen Rezeptor beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wird diskutiert, daß die Rezeptorphosphorylierung ein Signal für die Zelle ist, membrangebundene Ligand-Rezeptor Komplexe zu internalisieren (151).

5.6 Neusynthese und posttranslationale Modifikationen von Proteinen Lipopeptid-aktivierter Lymphozyten

Die Grenzverdünnungsanalysen zur Bestimmung der Frequenz der Vorläufer reaktiver B-Zellen bei verschiedenen Mausstämmen, die unterschiedliche Mitogenreaktivität von bestimmten Tumorzellklonen und die Reaktivität von LPS-Nonresponderzellen auf synthetische Lipopeptide ergaben, daß nicht alle B-Lymphozyten polyklonal aktiviert werden und sowohl gegenüber TPP als auch gegenüber LPS reaktiv sind. Aufgrund dieser unterscheidbaren biologischen Wirkung der Mitogene wurde untersucht, ob TPP- und LPS-aktivierte Milzlymphozyten unterschiedliche Proteine exprimieren und sich in ihren Oberflächenstrukturen unterscheiden.

Im Laufe der Lymphozytenaktivierung kommt es zu einer erhöhten Aufnahme radioaktiv markierter Aminosäuren (67) und zu einer vermehrten Neusynthese von Proteinen (158). Darunter finden sich auch solche, die spezifisch in aktivierten und in sich teilenden Zellen exprimiert werden. Um vorwiegend diese Proteine zu markieren, wurden die Milzzellen in Gegenwart von TPP oder LPS voraktiviert. Beide Substanzen wirken T-Zell-unabhängig und zeigen gegenüber T-Lymphozyten keinen biologischen Ef-

fekt, wie die Untersuchungen in dieser Arbeit über die Modifikation von Proteinen durch Phosphat und Experimente von K. Resch (121) bewiesen. Außerdem wurden die mitogenreaktiven Zellen durch die Voraktivierung angereichert, da die nichtreaktiven B-Zellen aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer (Halbwertszeit etwa 40 h) zum Teil absterben.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine ideale analytische Technik, um die Genexpression während der Lymphozytenaktivierung zu studieren. Eine empfindliche Methode zum Nachweis der exprimierten Proteine ist die biosynthetische Markierung der Polypeptide mit (^{35}S)Methionin (159). Da häufig nur geringe Zell- und Probenmengen verfügbar sind, sind lange Markierungszeiten und eine hohe spezifische Aktivität unumgänglich. Um letzteres zu gewährleisten, ist eine Verringerung des unmarkierten Methionins im Kulturmedium durch Dialyse des fötalen Rinderserums notwendig. Damit wird jedoch ein für das Wachstum der aktivierten Zellen essentieller Faktor reduziert. Ein weiteres Problem ist die Strahlungsempfindlichkeit aktivierter Zellen, insbesondere von B-Lymphozyten (159). Dies hat zur Folge, daß unter diesen Bedingungen nur wenige aktivierte B-Lymphozyten teilungsfähig sind, wodurch eine komplette und repräsentative Proteinmarkierung nicht erzielt werden kann.

Eine ^{3}H-Leucin-Markierung der gesamten Zellproteine von Milzlymphozyten, die 24 h voraktiviert waren, ergab keinen Unterschied im Proteinmuster bei TPP- und LPS-aktivierten Zellen. Aufgrund der Vielzahl der markierten Proteine und der Schlüsselrolle der Membranproteine bei der Weiterleitung des Aktivierungssignals wurden die weiteren Untersuchungen auf die Oberflächenmoleküle beschränkt. Die Analyse von ^{35}S-Methionin-markierten Membranproteinen aus B-Lymphozyten, die 4 h aktiviert waren, zeigte ebenfalls keine nachweisbaren Unterschiede. Die Auswertung wurde noch dadurch erschwert, daß neben den aktivierungsspezifischen Proteinen auch Proteine von ruhenden Lymphozyten markiert wurden (Daten nicht gezeigt). Bei Milzzellen, die 40 h mit dem jeweiligen Mitogen voraktiviert waren, konnten einige Unterschiede bei den membrangebundenen Proteinen festge-

stellt werden: nach LPS- ein Protein von 17 kDa, nach TPP-Stimulation vier Proteine von 30 kDa und eines von 35 kDa. Dies könnte bedeuten, daß von TPP-aktivierten, proliferierenden B-Lymphozyten Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert werden, die bei LPS-stimulierten Lymphozyten nicht auftreten (und umgekehrt). Aufgrund fehlender Referenzproteine kann derzeit keine Aussage über die Art oder Funktion dieser Proteine gemacht werden. Diese und weitere Unterschiede, die nur im Bereich der sauren Proteine auftraten, konnten in mehreren voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten jedoch nicht immer bestätigt werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde von J. Kettman bei der Analyse verschiedener T-Zell-Klone durch zweidimensionale Gelelektrophorese gemacht (160). Neben unterschiedlichen Proteinmustern bei den verschiedenen Klonen wurden bei der Untersuchung von Tochterklonen intraklonale Heterogenitäten entdeckt, für die bisher keine Erklärung gefunden wurde.

Bei den integralen Proteinen handelt es sich vorwiegend um sehr hydrophobe Proteine, die in Wasser schwer löslich sind. Die notwendige Zerstörung der Plasmamembran zur Isolierung löslicher Membranstrukturen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen (161). Als eine relativ einfache und schonende Methode hat sich Verwendung von Detergentien erwiesen. Besonders nicht-ionische Detergentien wie Nonidet P40 oder Triton X-100 haben sich bei der Solubilisierung von integralen Proteinen bewährt (101). Bei einem Überschuß an Detergens bilden sich Micellen, die dem hydrophoben Inneren der Lipiddoppelschicht ähnlich sind. Unter diesen Bedingungen wird die Plasmamembran zerstört, und Lipide und Proteinmoleküle lagern sich mit ihrem lipophilen Anteil in die Detergensmicellen ein. Während ionische Detergentien wie SDS die Proteine denaturieren, bleiben bei der Verwendung nicht-ionischer Detergentien die antigene Struktur und die enzymatische Aktivität weitgehend erhalten. Ein weiterer Vorteil der nicht-ionischen Detergentien liegt darin, daß der Zellkern intakt bleibt und somit der störende Einfluß durch DNA und Kernproteine verhindert wird. Das Zellsolubilisat enthält somit nur cytoplasmatische und membrangebundene Proteine. Viele Molekülkomplexe, die durch nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten

werden, z.B. die Histokompatibilitätsantigene, werden durch 0,5% Nonidet P40 so freigesetzt, daß sie in ihrer nativen Struktur vorliegen (162). Bei der Verwendung von Triton X-114 ist es weiterhin möglich, durch Erhöhung der Temperatur auf über 20°C die hydrophoben Proteine - fast ausschließlich Membranproteine - von den hydrophilen, cytoplasmatischen Proteinen abzutrennen und getrennt zu analysieren (102). Die Reproduzierbarkeit dieser Methode konnte anhand der Proteinmuster in dieser Arbeit bestätigt werden.

Neben einer Modifikation durch Oligosaccharide, Phosphatgruppen und Fettsäuren wurde eine Sulfatidierung von Membranproteinen beschrieben (163). In ^{35}S-Sulfat-markierten Extrakten von Milzlymphozyten wurde nachgewiesen, daß es sich bei den Haupthistokompatibilitätsantigenen der Klasse II um chondroitinsulfathaltige Proteoglycane handelt. Eine genauere Analyse ergab, daß die I-A-, die I-E-Antigene und die invarianten Ketten der B-Lymphozyten mit Chondroitinsulfat assoziiert sind. Allerdings stellte sich heraus, daß sich nur ein geringer Teil der gesamten Ia-Antigene mit radioaktivem Sulfat markieren ließ. Weiterhin scheint die Interaktion zwischen dem Glycan und den Proteinen nur vorübergehend zu erfolgen. Die Funktion dieser Derivatisierung für das Protein ist völlig unklar. Es wird diskutiert, daß das Chondroitinsulfat eine Rolle beim Transport der Ia-Antigene zur Plasmamembran spielt. Auch eine Beteiligung bei Ia-vermittelten Zell-Zell-Interaktionen wird nicht ausgeschlossen (163).

In dieser Arbeit wurde versucht, TPP- und LPS-aktivierte Lymphozyten mit (^{35}S)Sulfat zu markieren und durch zweidimensionale Gelelektrophorese die sulfatidierten Membranproteine zu analysieren. Trotz eines nachweisbaren Einbaus von radioaktivem Sulfat in die Membranfraktion und einer Expositionsdauer von 9 Wochen wurde bei den mitogenaktivierten Zellen keine diffuse Bande mit einer relativen Molekülmasse zwischen 46 und 70 kDa gefunden. Offensichtlich wird von den aktivierten B-Lymphozyten dieses Proteoglycan nicht exprimiert. Stattdessen wurden zwei äußerst schwach markierte Proteine von 55 kDa und 42 kDa

detektiert, deren Art und Funktion unbekannt ist. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß bei diesen Proteinen das Sulfat nicht kovalent gebunden, sondern unspezifisch adsorbiert ist.

5.7 Bindeproteine für synthetische Lipopeptide

Bisher ist ungeklärt, ob auf der Membranoberfläche von B-Lymphozyten für die verschiedenen polyklonalen B-Zell-Aktivatoren spezifische Bindungsstellen exprimiert werden, durch die das Aktivierungssignal ins Zellinnere weitergeleitet wird. Alternativ wird eine Auslösung der B-Lymphozytenaktivierung durch unspezifische Mitogen-Membran-Interaktionen diskutiert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Isolierung und Charakterisierung Lipopeptid-spezifischer Bindeproteine durch affinitätschromatographische Methoden.

Voraussetzung für die Isolierung von Bindeproteinen für synthetische Lipopeptide war die Synthese eines effektiven Affinitätsharzes. Der Ligand mußte eine geeignete funktionelle Gruppe besitzen, über die er an eine Matrix gekoppelt werden konnte. Weiterhin mußte er während der Kopplung chemisch stabil sein. Das synthetische Lipopeptid TPP erfüllte diese Bedingungen. Es konnte über die C-terminale Carboxylgruppe nach der Carbodiimid-Methode an porenkontrollierte Glaspartikel, die Aminopropylseitenketten als funktionelle Gruppen tragen, gekoppelt werden. Dieses Affinitätsharz hat im Vergleich mit anderen Materialien wie Sepharose 4B (51) den Vorteil, daß es gegenüber den meisten Lösungsmitteln stabil ist. Außerdem kann es autoklaviert werden. Durch wiederholt durchgeführte Aminosäureanalysen wurde sichergestellt, daß während der Isolierung Lipopeptid-spezischer Bindeproteine keine Abspaltung des Liganden von der Matrix erfolgte.

Um die Serumproteine zu identifizieren, die synthetische Lipopeptide nach intravenöser Applikation binden und zu den lymphatischen Organen transportieren, wurden die Maus-Serumproteine

auf einer TPP-Affinitätssäule aufgetrennt. Als Hauptbindeprotein wurde ein Protein von 67 kDa gefunden, das als Albumin identifiziert werden konnte. Unterstüzt wird dieses Ergebnis durch die Beobachtung, daß sich Zellen in einem albuminhaltigen Medium nicht mit FITC-Lipopeptid markieren ließen. Daneben wurden eine Reihe weiterer schwacher Proteinbanden detektiert. Diese Proteine wurden jedoch, wie auch ein geringer Teil des Albumins, von einer hydrophoben Kontrollsäule gebunden. Im übrigen ist eine der physiologischen Funktionen von Albumin die Bindung lipophiler Substanzen, welche in freier Form teilweise zellschädigend wirken. Lipid A, der für die biologische Wirksamkeit von LPS entscheidende Molekülteil, bindet ebenfalls an Albumin, daneben auch an Komplementproteine (164). Natives LPS, das weniger hydrophob ist, bildet zusätzlich Komplexe mit dem Lipoprotein hoher Dichte (HDL) (165).

Aus Lipopeptid-aktivierten Milzzellen von Balb/c-Mäusen konnte nach Markierung mit (^{3}H)Leucin und Detergenslyse der Zellen ein Hauptbindeprotein für TPP angereichert werden. Im Gegensatz zu früheren Experimenten wurden die an dem Lipopeptid-Affinitätsharz adsorbierten Proteine selektiv mit gelöstem TPP eluiert. Nach Auftrennung der eluierten Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgradientengel wurde eine Proteinbande von 35 kDa gefunden, die sich in einem modifizierten Gradientengel in zwei Proteine von 35 kDa und 33 kDa auflösen ließ. Durch Trennung dieser Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und nach ihrer relativen Molekülmasse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ließ sich ein saures Hauptbindeprotein von 35 kDa nachweisen. Daneben waren zwei weitere Proteine von 33 kDa und 32 kDa detektierbar, die sich in ihrem pI-Wert praktisch kaum von dem des Hauptbindeproteins unterschieden. Dieser Befund legt nahe, daß die Bindung von synthetischen Lipopeptiden an B-Lymphozyten nicht nur aufgrund einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem Mitogen und der Plasmamembran erfolgt, sondern daß spezifische Interaktionen zwischen dem Signalmolekül und zellulären Proteinen stattfinden.

Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Untersuchungen von W. Scheuer, der durch Affinitätschromatographie neben den MHC-Antigenen der Klassen I und II und den Immunglobulinen weitere, bisher nicht identifizierte Bindeproteine für Lipoprotein und synthetische Analoga anreicherte. Darunter war auch ein Protein von 32-35 kDa (49). Bei der Analyse von Bindeproteinen aus ^{125}J-markierten Membranen mitogenaktivierter Lymphozyten für ein schwach mitogenes Lipopeptid wurde neben anderen Proteinen ein Membranprotein mit einer ähnlichen relativen Molekülmasse gefunden (166). Weiterhin wurde aus Membranvesikeln, die mittels Stickstoffdekompressionsmethode isoliert worden waren, ein 32 kDa-Membranprotein isoliert, das von einer TPP-Affinitätssäule gebunden wurde (167). Diese Befunde sprechen außerdem dafür, daß es sich bei den gefundenen Bindeproteinen um membrangebundene und nicht um cytoplasmatische Proteine handelt. Aufgrund der Isolierung der Lipopeptid-Bindeproteine aus solubilisierten Milzlymphozyten ist nämlich nicht auszuschließen, daß es sich bei den spezifisch mit TPP eluierten Proteinen um intrazelluläre Proteine handelt, die eine hohe Affinität zu dem Mitogen besitzen.

Bisher war es nicht möglich, aufgrund der geringen verfügbaren Mengen von Lipopeptid-Bindeproteinen eine Aminosäureanalyse oder Teilsequenzbestimmung durchzuführen. Auch die Gewinnung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper war deshalb nicht durchführbar. Daher ist unbekannt, ob es sich bei den in dieser Arbeit durch Affinitätschromatographie isolierten Mitogenbindeproteinen um schon von anderen Autoren beschriebene Proteine handelt, z.B. dem p36 (152). Neben einem Hauptbindeprotein konnten zwei weitere Proteine von 33 kDa und 32 kDa nachgewiesen werden, die einen nahezu identischen pI-Wert wie das Hauptprotein besitzen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Proteinen um proteolytische Produkte des 36 kDa-Proteins, die während der Isolierung gebildet wurden, ihre Affinität zu dem synthetischen Lipopeptid aber dadurch nicht einbüßten. Anhand der relativen Intensität der einzelnen Proteinflecken erscheint das Vorliegen eines Molekülkomplexes aus diesen drei Proteinen weniger wahrscheinlich.

Kürzlich wurde beschrieben, daß bei der Isolierung von p36 mehrere proteolytische Abbauprodukte auftreten, wobei das Hauptprodukt ein 33 kDa-Protein ist (152). p35 und p36, auch Calpactin I und II genannt, gehören zu den Hauptsubstraten der tyrosinspezifischen Proteinkinasen und konnten in einer Reihe von Organen und Zellen nachgewiesen werden (168). Sie existieren als Monomer oder als Heterotetramer in Verbindung mit einem 10 kDa-Protein unter Bildung eines (p35 bzw. $p36)_2(p10)_2$-Komplexes von 85 kDa. p36 ist ein peripheres Membranprotein und wurde an der Innenseite der Lipiddoppelschicht nachgewiesen. Unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren wird es an einer Tyrosinseitenkette phosphoryliert. Inzwischen wurde es auch als Substrat der PK-C identifiziert (152). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von p36 mit anderen bekannten Proteinen ergab eine Homologie mit den Lipocortinen, die in vitro die Phospholipase A_2 inhibieren (168). Da das p36 normalerweise aus Fibroblasten und Epithelzellen isoliert wird, ist ein Vergleich mit den in dieser Arbeit isolierten Lipopeptid-Bindeproteinen allein anhand des pI-Wertes und der relativen Molekülmasse nicht möglich.

Zusätzlich zu diesen drei Proteinen konnten in einem SDS-Gradientengel nach einer längeren Expositionsdauer in der mit TPP eluierten Fraktion weitere Proteine detektiert werden. Diese Proteine waren jedoch im Gegensatz zum 35 kDa-Protein auch in der Fraktion sichtbar, die nicht von der Affinitätssäule gebunden wurde. Daneben traten nach der elektrophoretischen Trennung an der Gelfront niedermolekulare Komponenten auf, die nicht identifiziert werden konnten. Die Tatsache, daß mehr als 70% des markierten Zellysats am Affinitätsharz gebunden wurde, zeigte im übrigen, daß neben einer spezifischen Bindung von Proteinen unspezifische Wechselwirkungen stattfanden. Versuche von W. Scheuer, diese Proteine durch Voradsorption mit einem hydrophoben Palmitinsäure-Affinitätsharz zu eliminieren, schlugen aufgrund der geringen verfügbaren Mengen an radiomarkierten Lymphozytenproteinen fehl (167). Die Elutionsbedingungen wurden daher so modifiziert, daß im Gegensatz zu früheren Arbeiten nicht die gesamten gebundenen Proteine mit einem ionischen Detergens eluiert wurden, sondern eine selektive Desorp-

tion mit gelöstem TPP erfolgte. Es konnte gezeigt werden, daß die Elution der hier beschriebenen Lipopeptid-Bindeproteine nur mit TPP, nicht jedoch mit anderen hydrophoben oder strukturell ähnlichen, aber nichtmitogenen Verbindungen erfolgte (130).

In früheren Untersuchungen waren weitere Bindeproteine aus Milzlymphozyten für Lipoprotein und zwei dem N-Terminus von Lipoprotein analoge synthetische Lipopeptide angereichert und charakterisiert worden. Neben den leichten und schweren Ketten der Immunglobuline wurden Genprodukte des Haupthistokompatibilitätskomplexes (H-2D-, H-2K- und Ia-Antigene) auf der Affinitätssäule angereichert. Ähnliche Ergebnisse erhielten K. Yokoyama et al., die LPS-Bindeproteine auf B- und T-Lymphozyten affinitätschromatographisch isolierten und durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antiseren identifizierten (50). Eine spezifische Interaktion von Lipoprotein/Lipopeptiden mit MHC-codierten Proteinen wird auch deshalb postuliert, weil sich die Bindung von ^{3}H-LPS an B- und T-Lymphozyten durch anti-H-2 und anti-Ia Seren inhibieren ließ. Weiterhin konnte in Gegenwart von Kaninchenkomplement durch ein anti-Ia Serum die Proliferationsantwort auf LPS unterdrückt werden (51). R. Wolfert wies nach, daß bei B-Lymphozyten nach LPS-Stimulation verschiedene Membranproteine rearrangieren, wobei die I-A- und I-E-Antigene unterschiedliche Molekülkomplexe bilden (52,53).

Ein Nachteil der beschriebenen Anreicherungsmethode für Mitogen-bindende Proteine liegt darin, daß die Lymphozytenmembranen solubilisiert werden müssen. Dadurch können "versteckte" Bindungsstellen freigesetzt werden, die dem Signalmolekül an der intakten Zelle überhaupt nicht zugänglich sind. Problematisch ist ebenfalls, daß bei der affinitätschromatographischen Isolierung nicht unterschieden werden kann zwischen hochaffinen, biologisch relevanten Bindeproteinen, die bei geringen Ligandenkonzentrationen besetzt werden und solchen mit geringer Affinität, die in dem biologischen Prozeß keine Rolle spielen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde von anderen Arbeitsgruppen bei der Suche nach Rezeptoren das Verfahren der Photoaffinitätsmarkierung angewandt (169). Dabei wird ein radio-

aktiv markierter Ligand eingesetzt, der mit einer lichtsensitiven Ankergruppe versehen ist. Durch Belichten wird die reaktionsfähige Gruppe aktiviert und reagiert mit Aminosäureseitenketten des Rezeptors unter Bildung einer kovalenten Bindung. Aufgrund der bisher ungelösten Syntheseprobleme einer solchen Verbindung stand ein entsprechendes Lipopeptidderivat jedoch nicht zur Verfügung.

Welche der bisher isolierten Lipopeptid-Bindeproteine an der Signalerkennung und -weiterleitung beteiligt sind, kann aufgrund der verfügbaren Daten nicht entschieden werden. Identifiziert werden konnten bisher die schweren und die leichten Ketten der Immunglobuline, die Haupthistokompatibilitätsantigene der Klassen I und II und ein Bindeprotein von 35 kDa. Daß auch membrangebundene Immunglobuline eine Rolle bei der mitogenen Stimulation durch bakterielle Zellwandbestandteile spielen, konnte durch J. Andersson et al. gezeigt werden (170). F. Melchers et al. wiesen nach, daß die durch Lipoprotein ausgelöste Lymphozytenaktivierung durch Vorinkubation der Zellen mit Anti-IgM inhibiert wird (12). Von L. Forni wurde aus diesen Befunden ein Modell der B-Zell-Aktivierung vorgeschlagen, bei dem Oberflächenimmunglobuline, MHC-Antigene und ein hypothetischer Mitogenrezeptor einen funktionellen Komplex bilden. Zwischen diesen Membrankomponenten sollen bei der ruhenden B-Zelle niedrigaffine Wechselwirkungen stattfinden, die nach der Bindung eines Liganden an eines dieser Proteine zu einer koordinierten Interaktion aller komplexbildenden Strukturen führen. Die daraus resultierende Formation eines Rezeptors für Wachstumsfaktoren soll gleichzeitig zu einer Inaktivierung des Rezeptors für den Differenzierungsfaktor führen (171). Da die Expression all dieser Oberflächenmoleküle in einer Zellpopulation nicht koordiniert verläuft, ergibt sich daraus eine große funktionelle Heterogenität der ruhenden B-Zellen. So sollen nur die B-Lymphozyten durch LPS stimulierbar sein, bei denen der LPS-Rezeptor und die Ia-Antigene in nichtassoziierter Form vorliegen (172). Möglicherweise trifft dies auch für die Aktivierbarkeit durch synthetische Lipopeptide zu. Dies könnte die unterschiedliche

biologische Wirksamkeit von TPP und LPS gegenüber B-Lymphozyten eines bestimmten Mausstamms erklären.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung möglicher molekularer Mechanismen, durch die sich reaktive B-Lymphozyten durch synthetische Lipopeptide zur Proliferation und Differenzierung stimulieren lassen. Die Analyse konzentrierte sich auf die Wechselwirkung dieser Moleküle mit Oberflächenproteinen und auf die Identifizierung von Lipopeptid-Bindeproteinen.

Neben dem Lipopeptid Tripalmitoylpentapeptid (TPP) zeigten mehrere andere synthetische in der Aminosäurezusammensetzung nicht dem N-Terminus von Lipoprotein analoge Lipopeptide eine vergleichbare Dosis-Wirkungskurve der mitogenen Stimulation wie das native Lipoprotein. Bindungsstudien mit einem FITC-markierten Lipopeptid ergaben, daß diese Substanz aufgrund ihrer Lipophilie auch an nichtreaktive Zellen bindet, obwohl sie nur B-Zellen polyklonal aktiviert; nach der Bindung an die Zelloberfläche wurde der Hauptteil der membrangebundenen Fluoreszenz von der Lymphozytenoberfläche abgeschilfert. Vereinzelt wurde eine Internalisierung des Lipopeptids beobachtet. Die FACS-Analyse zeigte bei einer Lipopeptidkonzentration von 10 ug/ml schwache quantitative Unterschiede in der Bindungsfähigkeit zwischen mitogenreaktiven und nichtreaktiven Zellen.

Synthetische Lipopeptide aktivieren nicht nur B-Lymphozyten polyklonal, sondern lösen bei der humanen promyeloischen Leukämiezellinie HL-60 eine partielle Proliferationshemmung und eine Differenzierung zu reiferen Monozytenvorstufen aus.
Eine vermehrte Hydrolyse von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat wurde bei der Aktivierung von T-Lymphozyten durch Concanavalin A und bei der Aktivierung von B-Lymphozyten durch anti-IgM bestätigt gefunden, aber bei TPP- und LPS-aktivierten Lymphozyten nicht beobachtet. Weiterhin sprechen die Phosphoproteinmuster

von TPP- und LPS-aktivierten B-Lymphozyten eher gegen eine Schlüsselrolle der Proteinkinase C bei der Weiterleitung des Aktivierungssignals nach der Stimulation mit diesen Mitogenen. Von LPS-aktivierten B-Lymphoblasten wurden zwei saure membrangebundene Phosphoproteine von 60-63 kDa und 17 kDa exprimiert, die bei einer Stimulation der B-Zellen mit TPP nicht gefunden wurden. Eine ^{3}H-Leucinmarkierung der gesamten Zellproteine von Balb/c-Milzlymphozyten, die 24 h voraktiviert waren, ergab nach der zweidimensionalen Trennung keinen Unterschied bei TPP- und LPS-aktivierten Zellen. Die Analyse ^{35}S-Methionin-markierter Membranproteine aus B-Lymphozyten, die 4 h aktiviert waren, zeigte ebenfalls keine nachweisbaren Unterschiede. Milzzellen aus Nacktmäusen, die 40 h mit dem jeweiligen Mitogen voraktiviert waren, exprimierten jedoch unterschiedliche Membranproteine: nach TPP-Stimulation vier Proteine von 30 kDa und eines von 35 kDa, nach LPS-Stimulation ein Protein von 17 kDa. In TPP- und LPS-Blasten konnten weiterhin zwei ^{35}S-Sulfat-markierte Membranproteine von 55 kDa und 42 kDa nachgewiesen werden.

Im Mausserum wurde Albumin als Hauptbindeprotein für synthetische Lipopeptide affinitätschromatographisch identifiziert. Aus dem Zellsolubilisat von Lipopeptid-aktivierten, ^{3}H-Leucin-markierten Milzlymphozyten (Balb/c) wurden durch Affinitätschromatographie Bindeproteine für das B-Zell-Mitogen Tripalmitoylpentapeptid isoliert. Dabei diente an porenkontrollierte Glaspartikel gekoppeltes Mitogen als Adsorbens. Die gebundenen und selektiv mit 0,3 mg/ml TPP eluierten Proteine wurden durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und charakterisiert. Als Hauptbindeprotein wurde ein saures Protein von 35 kDa identifiziert; daneben wurden zwei weitere Proteine von 33 kDa und 32 kDa gefunden.

7. LITERATUR

(1) Hood, L.E., Weissmann, I.L., Wood, W.B., Wilson, J.H. (1984) Immunology. 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publish. Comp., Menlo Park, California.

(2) Melchers, F., Andersson, J. (1984) B cell activation: three steps and their variations. Cell 37, 715-720.

(3) Lanzavecchia, A. (1985) Antigen-specific interaction between T and B cells. Nature 314, 537-539.

(4) Sharon, N. (1976) Lectins as mitogens. In: Mitogens in Immunobiology (Oppenheim, J.J., Rosenstreich, D.L., eds.). Academic Press, New York, 31-41.

(5) Andersson, J., Sjöberg, O., Möller, O. (1972) Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides. Eur. J. Immunol. 2, 349-353.

(6) Bessler, W., Henning, U. (1979) Protein I and Protein II* from the outher membrane of Escherichia coli are mouse B-lymphocyte mitogens. Z. Immun. Forsch. 155, 387-398.

(7) Kuritani, T., Cooper, M.D. (1983) Human B cell differentiation. IV. Effect of monoclonal anti-immunoglobulin M and D antibodies on B cell proliferation and differentiation induced by T cell factors. J. Immunol. 131, 1306-1311.

(8) Greaves, M., and Janossy, G. (1972) Elicitation of selctive T- and B-lymphocyte responses by cell surface binding ligands. Transplant. Rev. 11, 89-115.

(9) Braun, V. (1975) Covalent lipoprotein from the outer membrane of E. coli. Biochim. Biophys. Acta 415, 335-377.

(10) Hantke, K., and Braun, V. (1973) Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the E. coli outer membrane. Eur. J. Biochem. 34, 284-296.

(11) McLachlan, A.D. (1978) The double helix coiled structure of murein-lipoprotein from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 121, 493-506.

(12) Melchers, F., Braun, V., and Galanos, C. (1975) The lipoprotein of the outer membrane of E. coli: A B lymphocyte mitogen. J. Exp. Med. 142, 473-482.

(13) Bessler, W., and Braun V. (1975) Mitogenität von Lipoprotein aus der äußeren Membran von E. coli gegenüber Lymphozyten verschiedener Spezies. Z. Immun.-Forsch. 150, 193.

(14) Johnson, R.B., Köhl, S., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Bessler, W. (1983) Synthetic analogues of the N-terminal lipid part of bacterial lipoprotein are B lymphocyte mitogens in vitro and in vivo. Immunobiol. 165, 27-35.

(15) Bessler, W., Resch, K., Hancock, E., and Hantke, K. (1977) Induction of lymphocyte proliferation and membrane changes by lipopeptide derivatives of the lipoprotein from the outer membrane of E. coli. Z. Immun.-Forsch. 153, 11-22.

(16) Andersson, J., Melchers, F., Galanos, C., Lüderitz, O. (1973) The mitogenic effect of lipopolysaccaride on bone marrow-derived mouse lymphocytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule. J. Exp. Med. 137, 943-953.

(17) Jung, G., Carrera, C., Brückner, H., Bessler, W. (1983) The mitogenic principle of Escherichia coli lipoprotein: synthesis, spectroscopic characterization, and mitogenicity of N-Palmitoyl-S-((2R,S)-2,3-dipalmitoyloxypropyl)-(R)-cysteine methyl ester. Liebigs Ann. Chem. 1608-1622.

(18) Wiesmüller, K.H., Bessler, W., Jung, G. (1983) Synthesis of the mitogenic S-(2,3-Bis(palmitoyloxy)propyl)-N-palmitoyl-pentapeptide from E. coli lipoprotein. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 593-606.

(19) Bessler, W.G., Cox, M., Lex, A., Suhr, B., Wiesmüller, K.H., Jung, G. (1985) Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. J. Immunol. 135, 1900-1905.

(20) Bessler, W., Johnson, R.B., Wiesmüller, K.H., Jung, G. (1982) B lymphocyte mitogenicity in vitro of a synthetic lipopeptide fragment derived from bacterial lipoprotein. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 767-770.

(21) Bessler, W., Johnson, R.B., Wiesmüller, K.H., Tittle, T. von, Jung, G. (1983) A synthetic lipopeptide derivative of bacterial lipoprotein is a potent B cell activator. In: Intercellular Communications in Leucocyte Function (Parker, J.W., O'Brian, R.L. eds.). John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 245-248.

(22) Grygar, G., Köhl, S., Dopfer, R., Bessler, W., Wiesmüller, K.H., Jung, G. (1985) Activation of human granulocytes by bacterial surface components and their synthetic analoga. In: Abstracts der 1. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Immunologie, Tübingen, WS 6-5.

(23) Hoffmann, P., Vordermeier, H.M., Biesert, L., Bessler, W. (1985) Induction of interleucin I in murine adherent cells by a synthetic analogue of bacterial lipoprotein, and by bacterial protein I. Immunobiol. 170, 33.

(24) Bessler, W.G., Flad, H.-D., Schade, U., Rietschel, E. (1984) Lymphokine induction in murine and human leukocytes by bacterial lipoprotein and a synthetic analogue, and by bacterial protein I. Lymphokine Research 3, 234.

(25) Möller, G. (1981) B lymphocyte activation. Immunology Today 2, 181-184.

(26) Melchers, F., Andersson, J., Lernhardt, W., Schreier, M.H. (1980) Roles of surface-bound immunoglobulin molecules in regulating the replication and maturation to immunoglobulin secretion of B lymphocytes. Immunol. Rev. 52, 89-115.

(27) Andersson, J., Coutinho, A., Melchers, F. (1979) Mitogen-activated B-cell blasts reactive to more than one mitogen. J. Exp. Med. 149, 553-564.

(28) Watson, J., Kelly, K., Largen, M., Taylor, B.A. (1978) The genetic mapping of a defective LPS response gene in C3H/HeJ mice. J. Immunol. 120, 422-424.

(29) Coutinho, A., Meo, T. (1978) Genetic basis for unresponsiveness to lipopolysaccharide in C57BL/10.Cr Mice. Immunogenetics 7, 17-24

(30) Forni, L. and Coutinho A. (1978) An antiserum which recognizes lipopolysaccharide-reactive B cells in the mouse. Eur. J. Immunol. 8, 56-62.

(31) Coutinho, A., Forni, L., Watanabe, T. (1978) Genetic and functional characterization of an antiserum to the lipid A-specific triggering receptor on murine B lymphocytes. Eur. J. Immunol. 8, 63-67.

(32) Forni, L., Coutinho, A. (1978) Receptor interactions on the membrane of resting and activated B-cells. Nature 273, 304-306.

(33) Ryan, J.L., Mc Adam, K.P.W.J. (1977) Genetic nonresponsiveness of murine fibroblasts to bacterial endotoxin. Nature 269,153-155.

(34) Glode, M., Jacques, A., Mergenhagen, S.E., Rosenstreich, D.L. (1977) Resistance of macrophages from C3H/HeJ mice to the in vitro cytotoxic effect of endotoxin. J. Immunol. 119, 162-166.

(35) Jakobovits, A., Sharon, N., Zan-Bar, I. (1982) Acquisition of mitogenic responsiveness by nonresponding lymphocytes upon insertion of appropriate membrane components. J. Exp. Med, 1274-1279.

(36) Eda, Y., Ohara, J., Watanabe, T. (1983) Restoration of LPS responsiveness of C3H/HeJ mouse lymphocytes by microinjection of cytoplasmatic factor(s) from LPS-stimulated normal lymphocytes. J. Immunol. 131, 1294-1299.

(37) Watanabe, T., Ohara, J. (1981) Functional nuclei of LPS-nonresponder C3H/HeJ mice after transfer into LPS-responder C3H/HeN cells by cell fusion. Nature 290, 58-59.

(38) Nygren, H., Dahlen, G., Möller, G. (1979) Bacterial lipopolysaccharide binds selectively to lymphocytes from lipopolysaccharide high-responder mouse strains. Scand. J. Immunol. 10, 555-561.

(39) Sultzer, B.M. (1976) Genetic analysis of lymphocyte activation by lipopolysaccharide endotoxin. Infect. Immun. 13, 1579-1584.

(40) Kabir, S., Rosenstreich, D.L. (1977) Binding of bacterial endotoxin to murine spleen lymphocytes. Infect. Immun. 15, 156-164.

(41) Symons, D.B.A., Clarkson, C.A. (1979) The binding of LPS to the lymphocyte surface. Immunology 38, 503-508.

(42) Kern, M. (1984) Selective binding of lipid A to responder and nonresponder B lymphocyte subpopulations. Rev. Infect. Dis. 6, 506-510.

(43) Bona, C., Juy, D., Truffa-Bachi, P., Kaplan, G.J. (1976) Binding, capping and internalization of lipopolysaccharide in thymic and non-thymic lymphocytes of the mouse. Biological and autoradiographic study. Journal de Microscopie et de Biologie Cellulaire 25, 47-56.

(44) Jacobs, D.M. (1984) Structural features of binding of lipopolysaccharide to murine lymphocytes. Rev. Infect. Dis. 6, 501-505.

(45) Kleine, B., Bessler, W., Coutinho, A. (1985) Segregation of reactivity to the mitogens lipopolysaccharide, lipoprotein and dextran sulfate in clones of the B cell lymphoma line WEHI 279.1. Eur. J. Immunol. 15, 207-209.

(46) Freitas, A.A., Coutinho, A.A. (1980) Characterization of mouse thoracic duct B lymphocytes. I. Evidence of functional heterogenicity. Eur. J. Immunol. 10, 772-776.

(47) Sprenger, R., Kleine, B., Bessler, W. (1985) Reactivity to bacterial lipoprotein and lipopolysaccaride - qualitative and quantitative analysis in a panel of murine strains including H-2 recombinant lines with established and newly derived haplotypes. Immunobiol. 170, 92.

(48) Scheuer, W., Frey, A., Maldener, M., Bessler, W.G. (1980) B-lymphocyte receptors for bacterial cell-surface components from mouse splenocytes and from a mouse macrophage cell line. Immunobiol. 157, 274-275.

(49) Scheuer, W., Biesert, L., Bessler, W.G. (1986) Binding of a synthetic analogue of mitogenic bacterial lipoprotein to murine major histocompatibility complex (MHC) gene products. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 1085-1094.

(50) Yokoyama, K., Mashimo, J., Kasai, N., Terao, T., Osawa, T. (1979) Binding of bacterial lipopolysaccharide to histocompatibility-2-complex proteins of mouse lymphocytes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 587-595.

(51) Niederhuber, J.E., Frelinger, J.A., Dugan, E., Coutinho, A., Shreffler, D.L. (1975) Effects of anti-Ia serum on mitogenic responses: I. Inhibition of the proliferative response to B cell mitogen, LPS, by specific anti-Ia sera. J. Immunol. 115, 1672-1676.

(52) Wolfert, R.L., Goodman, M.G., Weigle, W.O. (1984) Demonstration of activation-specific interactions among B lymphocyte membrane proteins by a photoreactive cross-linking agent. J. Immunol. 132, 2703-2708.

(53) Wolfert, R.L., Goodman, M.G., Weigle, W.O. (1985) Molecular associations of class II MHC antigens in mitogen-stimulated B cells. J. Immunol. 135, 1668-1673.

(54) Jung, G., Wiesmüller, K.H., Scheuer, W., Bessler, W. (1983) Synthesis and biological activities of the mitogenic principle of E. coli lipoprotein. Proc. 8th Am. Pept. Symp. (Hruby, V., Rich, D.H., eds.). Pierce Chem. Co., Rockford/III.

(55) Sutherland, E.W. (1972) Zur Wirkungsweise der Hormone. Angew. Chemie 84, 1117.

(56) Sieckmann, D.G. (1980) The use of anti-immunoglobulins to induce a signal for cell division in B-lymphocytes via their membrane IgM and IgD. Immunol. Rev. 52, 3-28.

(57) Chatenoud, L., Bach, J.-F. (1984) Antigenic modulation - a major mechanism of antibody action. Immunology Today 5, 20-25.

(58) Pernis, B. (1985) Internalization of lymphocyte membrane components. Immunology Today 6, 45-49.

(59) Singer, S.J. (1974) The molecular organization of membranes. Ann. Rev. Biochem. 43, 805-833.

(60) Traill, K.N., Wick, G. (1984) Lipids and lymphocyte function. Immunology Today 5, 70-76.

(61) Resch, K., Schneider, S., Szamel, M. (1983) Characterization of functional domains of the lymphocyte plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta 733, 142-153.

(62) Szamel, M. and Resch, K. (1981) Modulation of enzyme activities in isolated lymphocyte plasma membranes by enzymatic modification of phospholipid fatty acids. J. Biol. Chem. 256, 11618-11623.

(63) Qiastel, M.R., Kaplan, J.G. (1973) Early stimulation of potassium uptake in lymphocytes treated with phytohaemagglutinin. Exp. Cell. Res. 63 230-233.

(64) Hesketh, R. (1979) Cation fluxes and lymphocyte transformation. In: The Molecular Basis of Immune Cell Function (Kaplan, J.G., ed.) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, 39-56.

(65) Peters, J.H., Hausen, P. (1971) Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. 1. Stimulation of uridine uptake. Eur. J. Biochem. 19, 502-508.

(66) Peters, J.H., Hausen, P. (1971) Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. 2. Stimulation of "faciliated diffusion" of 3-O-methyl-glucose. Eur. J. Biochem. 19, 509-513.

(67) van den Berg, K.J. and Betel, I. (1973) Increased transport of 2-amino-isobutyric acid in rat lymphocytes stimulated with concanavalin A. Exp. Cell. Res. 76, 63-72.

(68) Miki, Y., Kishi, H., Muraguchi, A., Kishimoto, S., Yamamura, Y., Kishimoto, T. (1982) The requirement for esterase activation in T cell replacing facotr (TRF)-induced IgG production in a human B blastoid cell line. J. Immunol. 128, 675-678.

(69) Truneh, A., Albert, F., Golstein, P., Schmitt-Verhulst, A.-M. (1985) Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol esters. Nature 313, 318-320.

(70) Wolf, M., LeVine, H.III, May, W.S.Jr., Cuatrecasas, P., Sahyoun, N. (1985) A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca^{2+} and phorbol esters. Nature 317, 546-549.

(71) Coggeshall, K.M., Cambier, J.C. (1984) B cell activation. VIII: Membrane immunoglobulins transduce signals via activation of phosphatidylinositol hydrolysis. J. Immunol. 133, 3382-3386.

(72) Berridge, M.J. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglyerol as second messenger. Biochem. J. 220, 345-360.

(73) Carafoli, E., Penniston, J.T. (1986) Das Calcium-Signal. Spektrum der Wissenschaften, Nr. 1, 76-85.

(74) Berrigde, M.J. (1983) Rapid accumulation of inositol triphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. Biochem. J. 212, 849-858.

(75) Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature 308, 693-698.

(76) Isakov, N., Scholz, W., Altman, A. (1986) Signal transduction and intracellular events in T-lymphocyte activation. Immunology Today 7, 271-277.

(77) Bijsterbosch, M.K., Meade, C.J., Turner, G.A., Klaus, G.G.B. (1985) B lymphocyte receptors and polyphosphoinositide degradation. Cell 41, 999-1006.

(78) Chen, Z.Z., Coggeshall, K.M., Cambier, J.C. (1986) Translocation of protein kinase C during membrane immunoglobulin-mediated transmembrane signaling in B lymphocytes. J. Immunol. 136, 2300-2304.

(79) Morelec, M.-J., Ensergueix, D., Chaby, R., Girard, R. (1986) Opposite effects of lipopolysaccharide and dextran sulfate on the phosphorylation pathway of membrane phosphoinositides of murine B lymphocytes. In: Abstracts of the 6th International Congress of Immunology, Toronto, Canada, 271.

(80) Boron, W.F. (1984) The 'basic'connection. Nature 312, 312.

(81) Cambier, J.C., Monroe, J.G., Coggeshall, K.M., Ransom, J.T. (1985) The biochemical basis of transmembrane signalling by B lymphocyte surface immunoglobulin. Immunology Today 6, 218-222.

(82) Moolenaar, W.H., Tertoolen, L.G.J., de Laat, S.W. (1984) Phorbolester and diacylglycerol mimic growth factors in raising cytoplasmatic pH. Nature 312, 371-374.

(83) Hume, D.A., Weidemann, M.J. (1980) Mitogenic lymphocyte transformation. Research Monographs in Immunology, vol. 2. Biomedical Press, Elsevier/North-Holland, 199-201.

(84) Shier, W.T., Baldwin, J.H., Nielsen-Hamilton, M., Hamilton, R.T., Thanassi, N.M. (1976). Regulation of guanylate and adenylate cyclase activities by lysolecithin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1586-1590.

(85) Berridge, M.J. (1985) Die Signalübertragung in der Zelle. Spektrum der Wissenschaften, Nr. 12, 136-146.

(86) Dasch, J.R., Stavitsky, A.B. (1985) Mitogen-induced phosphorylation of cytosolic proteins in rabbit T- and B-lymphocytes. Molecul. Immunol. 22, 379-389.

(87) Carter-Su, C., Pratt, W.B. (1984) Receptor Phosphorylation. In: The Receptors, vol. 1 (Conn, P.M., ed.). Academic Press, New York, 542-585.

(88) Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., Leder, P. (1983) Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factors. Cell 35, 603-610.

(89) Mond, J.J., Signal, E., Kunz, J., Finkleman, F.D. (1981) Increased expression of I-region-associated antigen (Ia) on B cells after crosslinking of surface immunoglobulin. J. Immunol. 127, 881-888.

(90) Corbel, C., Melchers, F. (1983) Requirement for macrophage or for macrophage- or T cell-derived factors in the mitogenic stimulation of murine B lymphocytes by lipopolysaccharides. Eur. J. Immunol. 13, 528-533.

(91) Persson, U., Hammarström, L., Möller, E., Möller, G., Smith, C.I.E. (1978) The role of adherent cells in B and T lymphocyte activation. Immunol. Rev. 40, 78-101.

(92) Kettman, J.R., Soederberg, A., Lefkovits, I. (1986) Mitogenic activation of B cells in vitro: the properties of adherent accessory cells as revealed by partition analysis. J. Immunol. 137, 1144-1148.

(93) Dawe, C.J., Potter, M. (1957) Morphological and biological progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vivo and in vitro. Am. J. Pathol. 33. 603.

(94) Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., Gallo, R. (1979) Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood 54, 713-733.

(95) Mishell, B.B., Shiigi, S.M. (1980) Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

(96) Click, R.E., Benck, L., Alter, B.J. (1972) Enhancement of antibody synthesis in vitro by mercaptoethanol. Cell. Immunol. 3, 156-160.

(97) Herzenberg, L.A., Sweet, R.G., Herzenberg, L.A. (1976) Fluorescence-activated cell sorting. Scientific American 234, 108-117.

(98) Klinisches Labor (1974) E. Merck, Darmstadt, 15-20.

(99) Pertoft, H., Laurent, T.C. (1982) Sedimentation of cells in colloidal silicia (Percoll). In: Cell Separation. Methods and Selected Applications, vol. 1 (Pretlow, T.G., Pretlow, T., eds.). Academic Press , New York, 115-152.

(100) Kurnick, J.T., Oestberg, L., Stegagno, M., Kimura, A.K., Orn, A., Sjöberg, O. (1979) A rapid method for the separation of functional lymphoid cell populations of human and animal origin on PVP-silicia (Percoll) density gradients. Scand. J. Immunol. 10, 563-573.

(101) Cone, R.E., Marchalonis, J.J. (1974) Surface proteins of thymus-derived lymphocytes and bone marrow-derived lymphocytes. Selective isolation of immunoglobulin and the antigen by non-ionic detergents. Biochem. J. 140, 345-354.

(102) Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X 114 solution. J. Biol. Chem. 256, 1604-1607.

(103) O'Farell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.

(104) Gustafsson, A., Sundström, S., Ny, T., Lundgren, E. (1982) Rapid induction of seven proteins in human lymphocytes by interferon: correlation to natural killer cell activity. J. Immunol. 129, 1952-1959.

(105) Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

(106) Weber, K., Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

(107) Bonner, W.M., Laskey, R.A. (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46, 83-88.

(108) New England Nuclear (1979) A new approach to fluorography: EN^{3}HANCE. NEN Chemicals GmbH, Dreieich.

(109) Johnstone, A., Thorpe, R. (1982) Immunochemistry in practice. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

(110) Laskey, R.A., Mills, A.D. (1977) Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}J using intensifying screens and hypersensitized film. FEBS Letters 82, 314-316.

(111) Imboden, J.B., Stobo, J.D. (1985) Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. J. Exp. Med. 161, 446-456.

(112) Breitmeier, E., Jung, G. (1978) Organische Chemie II. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 175-179.

(113) König, W., Geiger, R. (1970) Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. Chem. Ber. 103, 788-798.

(114) Weetall, H.H., Filbert, A.M. (1974) Porous glass for affinity chromatography. Methods in Enzymology 34, 59-72.

(115) Scouten, W.H. (1974) Propyl lipoamide glass. Methods in Emzymology 34, 288-294.

(116) Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I. (1982) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Virology 120, 595-598.

(117) Arc, E.v., Faupel, M., Brugger, M. (1976) Das 4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan Reagens (TDM). Eine Modifikation der Chlor-o-Tolidin Farbreaktion für die Dünnschichtchromatographie. J. Chromatography 120, 224-228.

(118) Peters, J.H., Baumgarten, H., Schulze, M. (1985) Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung. Springer Verlag Heidelberg, 25-26.

(119) Sprenger, R. unveröffentlichte Ergebnisse

(120) Wetzel, G. und Bessler, W. unveröffentlichte Ergebnisse

(121) Resch, K., Bessler, W. (1981) Activation of lymphocyte populations with Concanavalin A or with lipoprotein and lipopeptide from the outer cell wall of Escherichia coli: Correlation of early membrane changes with the induction of macromolecular synthesis. Eur. J. Biochem. 115, 247-252.

(122) Tomasi, T.B. (1977) Serum factors which suppress the immune response. In: Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation (Lucas, D.O., ed.). Academic Press, New York, 219-248.

(123) Jung, G., Becker, G., Metzger, J., Wiesmüller, K.H., Bessler, W.G., Biesert, L., Bühring, H.-J., Muller, C. (1985) Potent B-lymphocyte mitogens as covalently bound carriers for the presentation of antigens and enhancement of immune response. Proc. 5th USSR/FRG Peptide. Symp., Odessa, May 16-23.

(124) Bessler, W.G., Simon, E., Rotering, H. (1980) Mitogenicity of a lipid-deficient lipoprotein from a mutant Escherichia coli strain. Infect. Immunity 28, 813-823.

(125) Bessler, W., Cox, M., Wiesmüller, K.H., Jung, G. (1984) The mitogenic principle of Escherichia coli lipoprotein: B-lymphocyte mitogenicity of the synthetic analogue palmitoyl-tetrapeptide (PAM-SER-SER-ASN-ALA). Biochem. Biophys. Res. Com. 121, 55-61.

(126) Hume, D.A., Weidemann, M.J. (1980) Mitogenic lymphocyte transformation. Research Monographs in Immunology, vol. 2. Biomedical Press, Elsevier/North-Holland, 87-139.

(127) Baxter, S.C., Fish, L.A. (1981) Parallel activities of fatty acid methyl esters and analogous phorbol diesters towards lymphocytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 103, 168-174.

(128) Haas, I., Simon, E., Bessler, W. (1979) Effect of the aggregational state on the mitogenicity of the lipoprotein from the outer membrane of Escherichia coli. Immunobiology 156, 418-428.

(129) Bessler, W.G., Frey, A., Haas, I., Resch, K. (1979) Interaction of B-lymphocyte mitogens with the plasma membrane of leukocytes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1128-1129.

(130) Biesert, L., Scheuer, W., Bessler, W.G. (1986) Interaction of mitogenic bacterial lipoprotein and a synthetic analogue with mouse lymphocytes. Isolation and characterization of binding proteins. Eur. J. Biochem. 162, 651-657.

(131) Biesert, L. unveröffentlichte Ergebnisse.

(132) Raff, M.C. (1976) Cell-surface immunology. Scientific American 234 (5), 30-39.

(133) Gaub, H., Sackmann, E., Büschl, R., Ringsdorf, H. (1984) Lateral diffusion and phase separation in two-dimensional solutions of polymerized butadiene lipid dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. A photobleaching and freeze fracture study. Biophys. J. 45, 725-731.

(134) Nicola, N.A., Vadas, M. (1984) Hematopoetic colony-stimulating factors. Immunology Today 5, 76-80.

(135) Sachs, L. (1978) Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. Nature 274, 535-539.

(136) Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., Gallo, R.C. (1979) Normal functional characterization of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. J. Exp. Med. 149, 969-974.

(137) Luikart, S.D., Maniglia, C.A., Sartorelli, A.C. (1984) Glycosaminoglycan synthesis during differentiation of HL60/HGPRT$^-$ leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Research 44, 2907-2912.

(138) Hume, D.A., Weidemann, M.J. (1980) Mitogenic lymphocyte transformation. Research Monographs in Immunology, vol. 2. Biomedical Press, Elsevier/North-Holland, 183-225.

(139) Wightman, P.D., Raetz, C.R.H. (1984) The activation of proteinkinase C by biologically active lipid moieties of lipopolysaccharide. J. Biol. Chem. 259, 10048-10052.

(140) Bell, R.M. (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. Cell 45, 631-632.

(141) Petersen, O.H., Bear, C. (1986) Two glucagon transducing systems. Nature 323, 18.

(142) Besterman, J.M., Duronio, V., Cuatrecasas, P. (1986) Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 6785-6789.

(143) Mills, G.B., Stewart, D.J., Mellors, A., Gelfand, E.W. (1986) Interleukin 2 does not induce phosphatidylinositol hydrolysis in activated T cells. J. Immunol. 136, 3019-3024.

(144) Farrar, W.L., Anderson, W.B. (1985) Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membrane. Nature 315, 233-235.

(145) Mizuguchi, M., Beaven, M.A., Ohara, Paul, W.E. (1986) BSF-1 action on resting B cells does not require elevation of inositol phospholipid metabolism or increased $(Ca^{2+})_i$. J. Immunol. 137, 2215-2219.

(146) Kleine, B., Biesert, L., Bessler, W.G. (1986) Specific expression of membrane proteins in lipopolysaccharide or lipoprotein activated B lymphocytes. Immunobiol. 173, 155-156.

(147) Cooper, J.A., Sefton, B.M., Hunter, T. (1983) Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. Methods in Enzymology 99, 387-402.

(148) Johnstone, A.P., DuBois, J.H., Crumpton, J. (1981) Phosphorylated lymphocyte plasma-membrane proteins. Biochem. J. 194, 309-318.

(149) Chaplin, D.D., Wedner, H.J., Parker, C.W. (1979) Protein phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes. Phosphorylation of endogenous plasma membrane and cytoplamic proteins. Biochem. J. 182, 537-546.

(150) Tedder, T.F., Boyd, A.W., Freedman, A.S., Nadler, L.M., Schlossman, S.F. (1985) The B cell surface molecule 31 is functionally linked with B cell activation and differentiation. J. Immunol. 135, 973-979.

(151) Shackelford, D.A., Trowbridge, I.S. (1986) Identification of lymphocyte integral membrane proteins as substrates for protein kinase C. J. Biol. Chem. 261, 8334-8341.

(152) Gould, K.L., Woodgett, J.R., Isacke, C.M., Hunter, T. (1986) The protein-tyrosine kinase substrate p36 is also a substrate for protein kinase C *in vitro* and *in vivo*. Mol. Cell. Biol. 6, 2738-2744.

(153) Cambier, J.C., Ransom, J.T. (1987) Molecular mechanisms of transmembrane signalling in B lymphocytes. Annual Review of Immunology, vol.5 (im Druck)

(154) Snow, E.C., Burke, T. (1987) The induction by specific antigen or phorbol esters of protein kinase C mediated phosphorylation of membrane associated proteins. Federation Proceedings 46, 759.

(155) Isakov, N., Altman, A. (1986). Lymphocyte activation and immune regulation. Immunology Today 7, 155-157.

(156) Kleine, L.P., Whitfield, J.F., Boynton, A.L. (1986) Ca^{2+}-dependent cell surface protein phosphorylation may be involved in the initiation of DNA synthesis. J. Cell. Physiol. 129, 303-309.

(157) Rübsamen, H. (1983) Biochemie der Tumorviren. Chemie in unserer Zeit 17, 169-180.

LEBENSLAUF

Lothar Biesert
geboren am 13.10.1956 in Essen

April 1963 - Juni 1967	Besuch der Grundschule in Essen
Juli 1967 - Juni 1976	Besuch des Gymnasiums in Essen
Juli 1976 - Sept. 1977	Wehrdienst in Rheine/Westfalen
Okt. 1977 - Sept. 1978	Studium generale am Leibniz-Kolleg Tübingen
Okt. 1977 - Aug. 1983	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
April 1981 - März 1982	Praktikumsaufenthalt am Max-Planck-Institut in Martinsried/München
Aug. 1983	Diplomprüfung in Biochemie
Okt. 1983 - Juli 1984	Diplomarbeit am Lehrstuhl Mikrobiologie II, Arbeitsbereich Immunologie, der Universität Tübingen bei Prof. Dr. W. Bessler
Sept. 1984 - Sept. 1987	Erstellung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Mikrobiologie II, Arbeitsbereich Immunologie, der Universität Tübingen und am Institut für Immunbiologie der Universität Freiburg unter Anleitung von Prof. Dr. W. Bessler
seit Januar 1987	wissenschaftlicher Angestellter im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

Meine akademischen Lehrer waren:

Anderer, Baron, Bayer, Bessler, Bisswanger, Braun, Eisele, Feine, Feldmann, Gerisch, Grell, Guglielmi, Hanak, Häfelinger, Hagenmaier, Huber, Jung, Kallee, Krug, Lindner, Mauser, Mecke, Metzner, Oelkrug, Poralla, Probst, Reutter, Seyffert, Sonnenbichler, Staudt, Voelter, Weber, Wegmann, Weitzel, Wendel, Weser, Zähner, Zeil, Zillig.